

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

MİKROAKIŞKAN SİSTEMLERDE EMPEDANS BAZLI KAN HÜCRE
TESPİTİ

İsmail BİLİCAN

MAYIS 2017

Fizik Anabilim Dalında İsmail BİLİCAN tarafından hazırlanan MİKROAKIŞKAN SİSTEMLERDE EMPEDANS BAZLI KAN HÜCREŚİ TESPİTİ adlı Doktora Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Saffet NEZİR

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Doktora Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Talip KIRINDI

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan	: Prof. Dr. Uğur SARI	_____
Üye (Danışman)	: Prof. Dr. Talip KIRINDI	_____
Üye	: Doç. Dr. Mustafa TÜRK	_____
Üye	: Doç. Dr. Hakan GÜNGÜNEŞ	_____
Üye	: Yrd. Doç. Dr. M. Burak TÜRKÖZ	_____

24.05.2017

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Doktora derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

ÖZET

MİKROAKIŞKAN SİSTEMLERDE EMPEDANS BAZLI KAN HÜCRESİ TESPİTİ

BİLİCAN, İsmail

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Fizik Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Talip KIRINDI

Mayıs 2017, 91 sayfa

Bu tez çalışmasında hücrelerin sayımı, tanımlanması ve sınıflandırılması için yaygın bir teknik olan empedans akış sitometrisi tekniği kullanılarak mikroakışkan bir sistem geliştirilmiştir. Bu çalışmada kapasitif-impedimetrik biyosensörler araştırılarak, mikroakışkan sistemin duyarlılık sınırlarının geliştirilmesi ve bunun bir sonucu olarak kan hücresi tespiti yapılabilmesi hedeflenmiştir. Hücreler elde edilmesi ve manipüle edilmesi zor parçacıklar olduğundan mikroakışkan sistemi geliştirmek için hücre ile eşdeğer elektriksel özelliğe sahip olan 6 μm çapındaki polistiren mikro küreler kullanılmıştır. Mikroakışkan sistem içerisinden mikro küre taşıyan 2.5 S/m iletkenliğine sahip bir sıvı geçirilerek, sıvı içerisindeki mikro küreler elektriksel empedans ölçümü yoluyla tespit edilmiştir. Mikroakışkan sistemin hassasiyetini artırmak için sonlu elemanlar metodu ile simülasyonlar yapılarak parçacıkların kanal içerisindeki konum ve boyutlarına bağlı olarak verdiği sinyaller hesaplanmıştır. Empedans değişiminin elektro aktif bölgede yer değiştiren parçacığın hacmi ile orantılı olduğunu göstermek için ise farklı boyutlardaki elektrot ve kanalların performansı teorik ve deneysel olarak incelenmiştir. En uygun kanal ve elektrot geometrisini bulabilmek için öncelikle elektrot boyutu sabit tutularak farklı

kanal boyutlarına sahip mikroçiplerde, daha sonra kanal boyutu sabit tutularak farklı elektrot boyutlarına sahip mikroçiplerde deneyler yapılmıştır. Kanal ve elektrot genişliği azaldıkça mikro kürenin empedans değişiminin arttığı ve elde edilen sonuçlarında Maxwell mixture teorisi ile uyumlu olduğu gösterilmiştir. Bu ön çalışmalardan yola çıkarak 4, 6 ve 8 µm çaplarındaki polistiren mikro küreleri yüksek hassasiyet ile ayırt edebilen bir elektrot ve kanal yapısı geliştirilmiştir.

Hücre sınıflandırma cihazları saniyede binlerce hücre analizi yapabilir fakat genellikle küçük bir örnek hacminin kullanımı için uygun olmayan komplike makinalardır. Bu çalışmada empedansa dayalı mikroakışkan sistem içerisinde alınan bir damla kan örneği kullanılarak kırmızı kan hücreleri sayılmış ve kan örneğindeki farklı mikro parçacıklar tespit edilmiştir. Bu sayede kan sayım cihazı teknolojisine dair bir altyapı geliştirilmiştir. Bu altyapı ile kan hastalıklarının tespitine yönelik, çok az miktarda kan ile dahi cevap verebilen, portatif sistemlerin geliştirilebilmesinin zemini oluşturulmuştur.

Anahtar kelimeler: Mikroakışkanlar, Kırmızı Kan Hücresi, Empedans Akış Sitometrisi, Parçacık Sayımı, Eş Düzlemsel Elektrot

ABSTRACT

IMPEDANCE-BASED BLOOD CELL DETECTION IN MICROFLUIDIC SYSTEMS

BILICAN, Ismail

Kirikkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Physics, Ph. D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Talip KIRINDI

May 2017, 91 pages

In this dissertation, a microfluidic system was developed by using the impedance flow cytometry technique that is in common use for cell counting, identification, and classification. Through investigation of capacitive-impedimetric biosensors, this work aimed to improve the sensitivity levels of the microfluidic system and to identify blood cells as a result of it. Since it is difficult to obtain and manipulate cells, 6 μm polystyrene micro beads having equivalent electrical properties with cells were employed to develop the microfluidic system. By passing a fluid, which has 2.5 S/m conductivity and carries the micro beads within the microfluidic system, the micro beads were identified impedimetrically. To improve the sensitivity of the microfluidic system, simulations were performed with the Finite Element Method (FEM) to calculate the signals that the particles give depending on their locations and sizes within the channels. In order to show that the impedance change is proportional on the volume of the particle changing its location within the electro-active region, the performances of electrodes and channels with different dimensions were investigated both theoretically and experimentally. To find the optimum channel and electrode geometries, firstly, experiments were performed with microchips with fixed

electrode dimensions and varying channel dimensions. This was followed by employing microchips with fixed channel dimensions and varying electrode dimensions. It was shown that the impedance change of the bead increases as the channel and electrode widths decrease and the results match well with the Maxwell mixture theory. With these primary works, an electrode-channel structure was developed which can sort 4, 6, 8 μm diameter polystyrene beads with high sensitivity.

Cell classification devices can perform thousands of cell analyses within seconds, but they are not suitable for the use of small volume samples. In this work, impedance based microfluidic system was used to count red blood cells and sense different micro particles from a drop of blood sample. Thanks to that, an infrastructure was developed for the blood counter technology. With this infrastructure, a ground was formed to develop portable systems, even sensitive to very small volume blood samples, for the diagnosis of hematologic diseases.

Keywords: Microfluidics, Red Blood Cell, Impedance Flow Cytometry, Particle Counting, Coplanar Electrode

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca göstermiş olduğu özveri ve sabrıyla her zaman yanımda olan, engin tecrübe ve akademik birikimleri ile desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Talip KIRINDI'ya,

Bu tez çalışmasının konusunun belirlenmesi, çalışmalarım sürecinde ve tezimin yazımı esnasında yardımlarını esirgemeyen ve büyük fedakârlıklarla bana yol gösteren kıymetli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Çağlar ELBÜKEN'e, tez izleme komitesinde görev alan ve tecrübelerini samimiyetle benimle paylaşan hocalarım Sayın Doç. Dr. Mustafa TÜRK ve Sayın Doç. Dr. Hakan GÜNGÜNEŞ'e, bu çalışmayı bilim dünyasına kazandırmamda emeği geçmiş tüm Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi çalışanlarına, ayrıca değerli mesai arkadaşlarım Ömer SONKAYA ve Sena ÖZBAY'a,

Tezimin laboratuvar çalışmaları sürecinde büyük katkılar sağlayan arkadaşlarım Dr. Mustafa Tahsin GÜLER, Merve MARÇALI, Amir GHOBADİ ve Pelin Kübra İŞGÖR'e, tez yazım sürecinde yardımcı olan arkadaşlarım Ziya IŞIKSAÇAN ve Dr. İskender ÖZKUL'a,

Hayatım boyunca olduğu gibi çalışmalarım sırasında da her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen kıymetli babam Sürmeli BİLİCAN ve sevgili annem Hafıye BİLİCAN'a teşekkür ederim.

2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında sağladığı destekten ötürü TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Literatür Özeti	6
1.2. Tezin Amacı	8
2. MATERYAL VE YÖNTEM	9
2.1. Mikroakışkanlar	9
2.2. Mikroakışkan Empedans Sitometrisi	12
2.2.1. Mikroakışkan Coulter Sayacı	13
2.2.2. Empedans Akış Sitometrisi	15
2.2.3. Mikro Elektriksel Empedans Spektroskopisi	17
2.2.4. Tıbbi Tedavi ve Tanı Uygulamaları	18
2.3. Dielektrik Parçacıkların Elektriksel Tespiti	19
2.4. Comsol Multiphysics	23
2.5. Deneysel Materyal ve Yöntem	26

2.5.1. Isısal Buharlaştırma Sistemi	26
2.5.2. Fotolitografi	27
2.5.3. Sensör ve Elektrot Fabrikasyonu	29
2.5.4. Mikro Kanalların Fabrikasyonu	33
2.5.5. Ölçüm Sistemi.....	42
2.5.6. Tekrar Kullanılabilir Bağlanma Yöntemi	45
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	48
3.1. Mikro Parçacık Tespiti.....	48
3.2. Mikroakışkan Çip Simülasyonu	53
3.3. Farklı Boyutlardaki Mikroçiplerde Mikro Parçacık Tespiti	59
3.3.1. Kanal Boyutuna Bağlı Mikro Parçacık Tespiti	60
3.3.2. Elektrot Boyutuna Bağlı Mikro Parçacık Tespiti	64
3.4. Farklı Boyutlardaki Mikro Parçacıkların Ayırt Edilmesi	68
3.5. Kırmızı Kan Hücresi (RBC) Tespiti	71
4. SONUÇLAR	74
5. KAYNAKLAR	76
ÖZGEÇMİŞ	90

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Altın ve krom metallerine ait referans faktörleri.....	27
3.1. Mikro kürenin kanal içerisindeki konumuna göre hesaplanan empedans sinyalleri	55
3.2. Mikro kürenin kanal içerisindeki farklı konumlarda kanal boyutuna bağlı Comsol Multiphysics’de hesaplanan empedans sinyalleri.....	58
3.3. Mikro kürenin kanal içerisindeki farklı konumlarda elektrot boyutuna bağlı Comsol Multiphysics’de hesaplanan empedans sinyalleri.....	58
3.4. Kanal genişliğine bağlı alınan deneysel sonuçların teorik hesaplamalar ile karşılaştırılması.....	64
3.5. Elektrot geometrisine bağlı alınan deneysel sonuçların teorik hesaplamalar ile karşılaştırılması.....	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Reseptör ve ligand	2
1.2. Kanserli antijenlerin algılanması	3
1.3. Akış sitometrisi	4
1.4. Cantilever biyosensör	5
2.1. Mikro kanal içerisinde mikro damlacık oluşumu.....	10
2.2. Laminer akış	11
2.3. Levhalar arası dielektrik materyal ile dolu paralel levha kapasitörü.....	19
2.4. İletkenliğin empedans üzerindeki etkisi.....	22
2.5. İki farklı dielektrik katmana sahip paralel levha kapasitörü	22
2.6. Farklı boyutlara sahip meshing a) 1 μm b) 6 μm	25
2.7. Isısal buharlaştırma sistemi (UNAM-Vaksis PVD Vapor – 3S).....	27
2.8. Fotolitografi ile örneğin transferinin gösterimi	28
2.9. Fotolitografi işlemlerinin yapıldığı sarı oda (UNAM).....	29
2.10. Sensör fabrikasyonu için hazırlanan maskenin görüntüsü	29
2.11. Fotolitografi sonrası elektrotların optik mikroskop görüntüsü	30
2.12. Sensör ve elektrot fabrikasyonu süreci	31
2.13. Üretilen sensörün görüntüsü	32
2.14. Eş düzlemsel (Coplanar) elektrotların optik mikroskop görüntüsü.....	33

2.15.	Mikro kanalların fabrikasyonu için hazırlanan maskenin görüntüsü	34
2.16.	Kalıp üretimi. 1) Fotorezist ile kaplama, 2) UV ışık, 3) Banyolama işlemi, 4) Kalıp	35
2.17.	Üretilen kalıbın görüntüsü	36
2.18.	Vakum sistemi	37
2.19.	Mikro kanal üretim süreci.....	38
2.20.	PDMS mikro kanal görüntüsü	39
2.21.	Mikro kanalın SEM de alınmış a) profil görüntüsü, b) kesit görüntüsü.....	40
2.22.	Plazma asher cihazı.....	41
2.23.	Üretilen mikroakışkan çip görüntüsü.....	42
2.24.	Ölçüm sistemi düzeneği.....	43
2.25.	6 μ m çapındaki mikro kürelerin SEM görüntüsü.....	44
2.26.	Mikro elektrot üzerine mikro kanal entegre edilerek oluşturulan mikro çipin optik mikroskop görüntüsü	45
2.27.	Kanalları sıkıştırmak için tasarlanan Pleksi	46
2.28.	Pleksi kullanılarak elde edilen mikroakışkan çip görüntüsü	47
3.1.	Mikro küre geçişi sırasında oluşan empedans verisi.....	48
3.2.	Cmsol Multiphysics’de yapılan simülasyon ile kanal içerisindeki elektrik alan çizgilerinin dağılımı	49
3.3.	Mikroakışkan sistemin a) Eşdeğer devre modeli b) Frekansa bağlı empedans grafiği.....	50
3.4.	Mikro kürenin elektrotlar üzerinden geçerken elektrik alan çizgilerini engellemesinin Cmsol Multiphysics’de yapılan simülasyon ile gösterimi .	52

3.5.	Mikroakışkan çipin geometrik modeli	53
3.6.	Comsol Multiphysics’de hesaplanan a) Elektrik alan değişimi diyagramı b) Yık diyagramı	54
3.7.	Mikro kürenin mikro kanal içerisindeki konumları	55
3.8.	10-20-50 µm genişliğindeki elektrotlarda yapılan hesaplamalar	56
3.9.	Mikro kürenin kanal içerisindeki konumlarının kesit görüntüsü	57
3.10.	Düşük boyutlu mikro kanalların SEM de alınan kesit görüntüleri.....	60
3.11.	6 µm çapındaki mikro kürelerin kanal genişliğine bağlı empedans verileri .	61
3.12.	6 µm çapındaki mikro kürelerin farklı kanal genişliklerindeki empedans değişimine bağlı histogram grafiği	62
3.13.	Kanal genişliğine bağlı sinyal/gürültü oranı	63
3.14.	6 µm çapındaki mikro kürelerin elektrot genişliğine bağlı empedans verileri	65
3.15.	6 µm çapındaki mikro kürelerin farklı elektrot geometrisindeki empedans değişimine bağlı histogram grafiği	66
3.16.	Elektrot geometrisine bağlı sinyal/gürültü oranı.....	67
3.17.	6 µm çapındaki mikro kürelerin empedans verisi	68
3.18.	4, 6 ve 8 µm çapındaki polistiren mikro kürelere ait SEM görüntüleri	69
3.19.	4, 6 ve 8 µm çapındaki polistiren mikro kürelerin empedans değişimine bağlı histogram grafiği.....	70
3.20.	4, 6 ve 8 µm çapındaki mikro kürelere ait Empedans-Θ grafiği.....	71
3.21.	Kırmızı kan hücresi elektrot üzerinden geçtiğinde alınan empedans sinyali	72
3.22.	Kırmızı kan hücrelerinin empedans değişimine bağlı histogram grafiği	73

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER DİZİNİ

Re	Reynolds sayısı
v	Akım hızı
d	Kanal çapı
μ	Kinematik viskozite
ω	Açısal frekans
C	Kapasitans
C_{dl}	Çift katmanlı kapasitans
C_{par}	Parazit kapasitans
Z	Empedans
A	Levha alanı
d	Levhalar arası mesafe
ϵ_0	Boşluğun dielektrik sabiti
w	Elektrot genişliği
g	Elektrotlar arası mesafe
h	Yükseklik
P	Basınç
V	Voltaj
R	Direnç

KISALTMALAR DİZİNİ

EDL	Elektriksel çift katman
PBS	Fosfat tamponlu çözelti
RBC	Kırmızı kan hücresi
CTC	Dolaşımdaki tümör hücreleri
POC	Yerinde hasta teşhisi
HCG	Human chorionix gonadotropin
PGE	Polielektrolitik jel elektrot
DEP	Dielektroforezis
PMN	Polimorfonükleer
FEM	Sonlu elemanlar metodu
m-EIS	Mikro elektriksel empedans spektroskopisi
HMDS	Heksametildisilazan
PDMS	Polidimetilsiloksan
UNAM	Ulusal nanoteknoloji araştırma merkezi
PVD	Fiziksel buhar biriktirme
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
QCM	Kuartz kristal mikro denge
MOSFET	Metal oksit yarıiletken alan etki transistörü
DI	İyonlarından arındırılmış
DC	Doğru akım

AC Alternatif akım

UV Ultraviyole

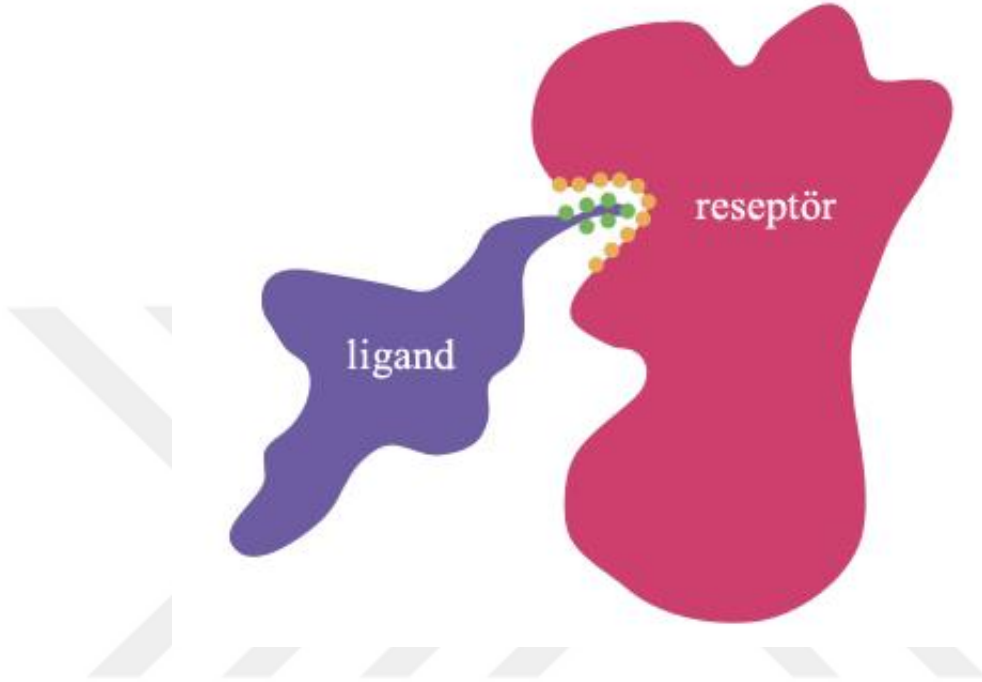


1. GİRİŞ

Günümüzde sağlık teknolojilerinin gelişmesiyle birlikte hastalıkların daha düşük maliyetle ve daha kısa sürede tespit edilmesinde biyosensörler çok önemli bir yere sahiptir. Genel anlamda biyosensörler, biyoloji, fizik, kimya, biyokimya, malzeme bilimi ve mühendislik gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden çok-disiplinli bir anlayış çerçevesinden yararlanılarak ve biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçimlilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesiyle geliştirilen biyoalgılayıcı cihazlar olarak tanımlanabilirler. Biyosensörler, biyolojik yapıları algılayan sensörler veya reseptör birimi biyomoleküler yapıda olan sensörlerdir [1]. Elektronik duyu organları da diyebileceğimiz bu cihazlar, çalışma şekillerine göre ve dönüştürücü adı verilen yapılarına göre çeşitlere ayrılmaktadır. Isısal, mekanik, kimyasal, akustik, radyoaktif sensörler ve biyosensörler bunlardan bazılarıdır.

Biyosensör teknolojisinin tarihsel gelişimine bakıldığında bu alandaki literatüre geçen ilk bilimsel çalışmaların enzim sensörleri olduğu görülmektedir. Biyosensörlerin tarihi 1950'li yılların ortalarında L. C. Clark'ın Cincinnati Hastanesinde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O_2 miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlar. 1962 yılında Clark ve Lyons ile 1967'de Updike ve Hick tarafından yayınlanan glukoz tayinine yönelik glukoz oksidaz enzim elektrotları bu konudaki ilk örnekleri oluşturmuştur [2,3]. Böylece, Clark ve Lyons glukoz oksidaz enzimini O_2 elektrotu ile birleştirerek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başarmışlardır. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin yüksek spesifikliğini, diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrot) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Biyosensörler bugün sağlık (diagnostik, pronostik vb.), gıda, su, kalite kontrol, çevresel incelemeler gibi birçok alanda kullanılır hale gelmiştir. Clark ve arkadaşları tarafından bulunan sensör günümüzde en çok kullanılan biyosensör ve yerinde tanı cihazı olarak adlandırabileceğimiz ev tipi glukometrelerin temelini oluşturmuştur. 1960'larda bulunan bir sistem, aradan yaklaşık 30 yıl gibi bir süre geçtikten sonra diyabet hastaları tarafından evde kullanabilir bir formata dönüştürülmüştür. Bu sistem sayesinde diyabete bağlı riskler (ölüm ve sakatlıklar)

ciddi oranda azalmıştır. Bu örnek bize biyosensörlerin iyi bir mühendislik ile birleştirildiğinde yaşamımızda ne kadar hayati bir öneme sahip olabileceğini göstermiştir.

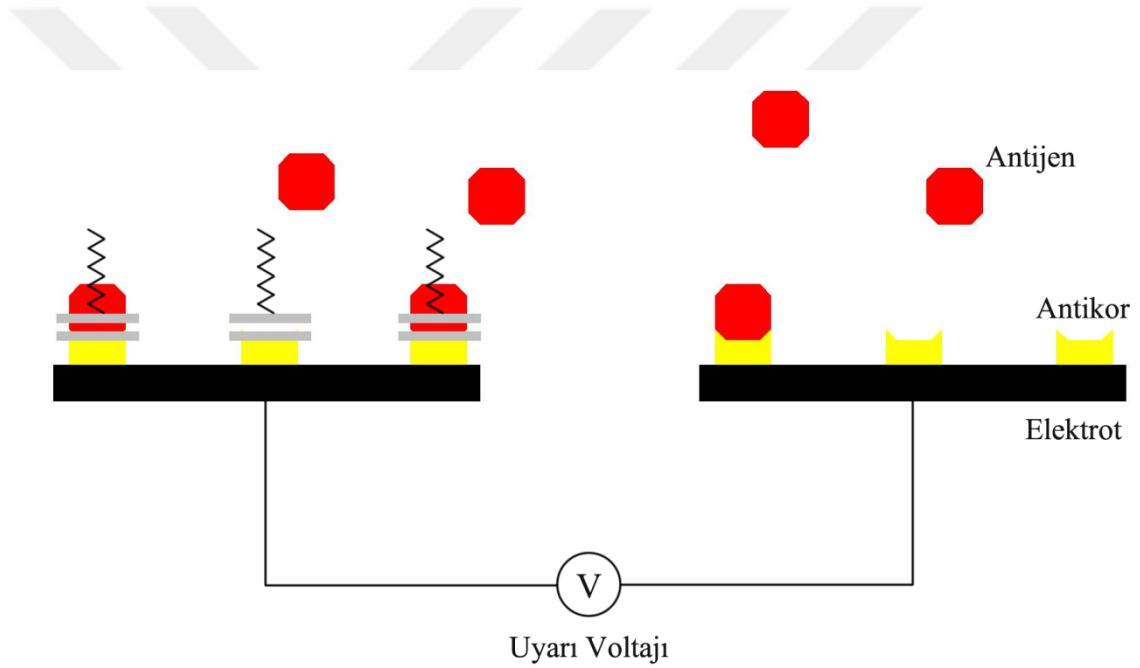


Şekil 1.1. Reseptör ve ligand

Biyolojik bir hedefi algılayan ve ölçülebilir bir sinyaldeki değişimleri cevap olarak veren cihazlara biyosensör denir. Biyosensörler reseptörlü ve reseptörsüz olmak üzere iki temel kategoriye ayrılabilir. Şekil 1.1.'de reseptörün bir molekül olarak tanımlandığı gösterilmektedir. Reseptörü olan biyosensör, reseptörden gelen tepkiye göre çalışmaktadır. Eğer ortam ligand içeriyorsa, reseptör reaksiyon verir ve reaksiyon optik veya elektrik sinyali olarak ölçülür. Son zamanlarda, altın yüzey ile fonksiyonel hale getirilen özgün antikorların reseptör olarak kullanılması metodu, kanser belirtecinin tespitinde kullanılmaktadır. Antijenin yüzeye bağlanması ile elektrokimyasal özellikleri değişmektedir (Şekil 1.2.). Reseptör olmayan biyosensörlere kamera, mikroskop ve bilgisayar sistemi örnek verilebilir. Kan

örnekleri, iki cam lamelin arasına konularak mikroskop ile gözlemlenebilmektedir. Hücre türleri gözle veya görüntü işleme programları ile ayırt edilebilmektedir.

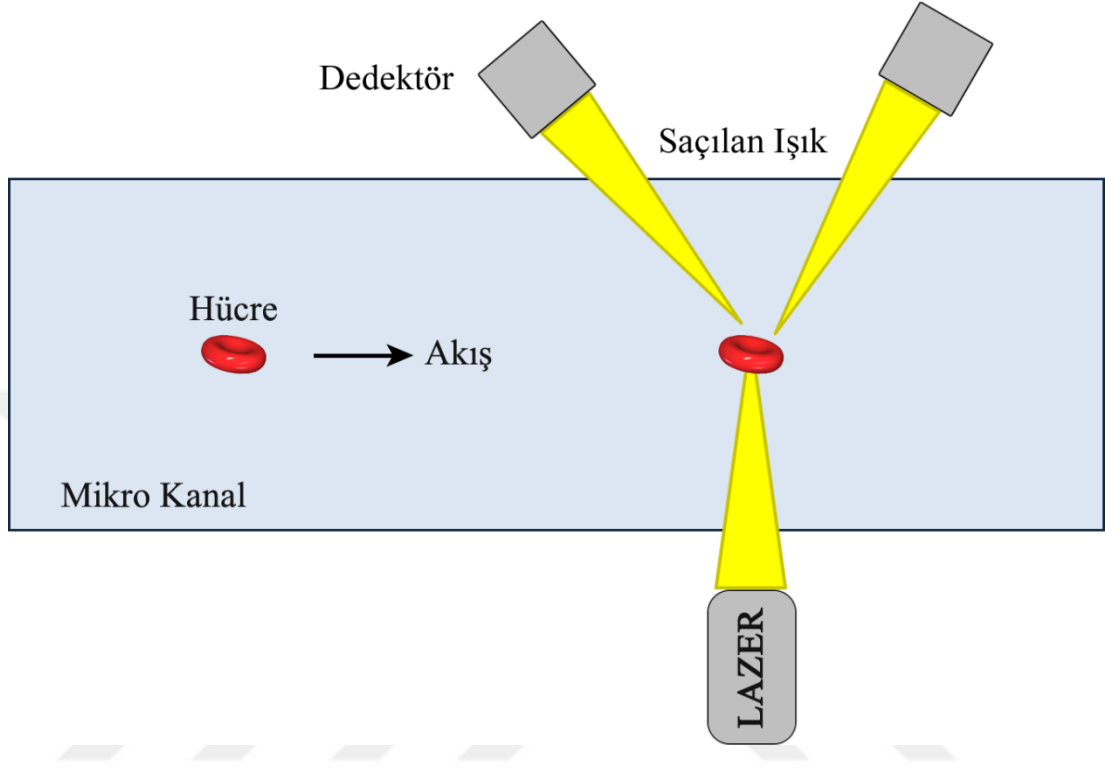
Günümüzde kanserin teşhisi, mikroskop altında kan örneğinin incelenmesi ve büyüyen hücrelerin araştırılması metodu kullanılarak yapılmaktadır [4]. Kanın bir birim hacmindeki kırmızı kan hücrelerini (RBC) sayan hemositometre bu kategoriye diğer bir örnektir. Hemositometrede mikron ölçekli yüksekliğe sahip nano litre mertebesinde olan iyi tanımlanmış dar bir bölme yer alır. Seyreltilmiş kan örneği bu dar bölme yerleştirilir ve mikroskopla sayılır. RBC sayısı, sayı/ml ölçü birimiyle verilmektedir.



Şekil 1.2. Kanserli antijenlerin algılanması

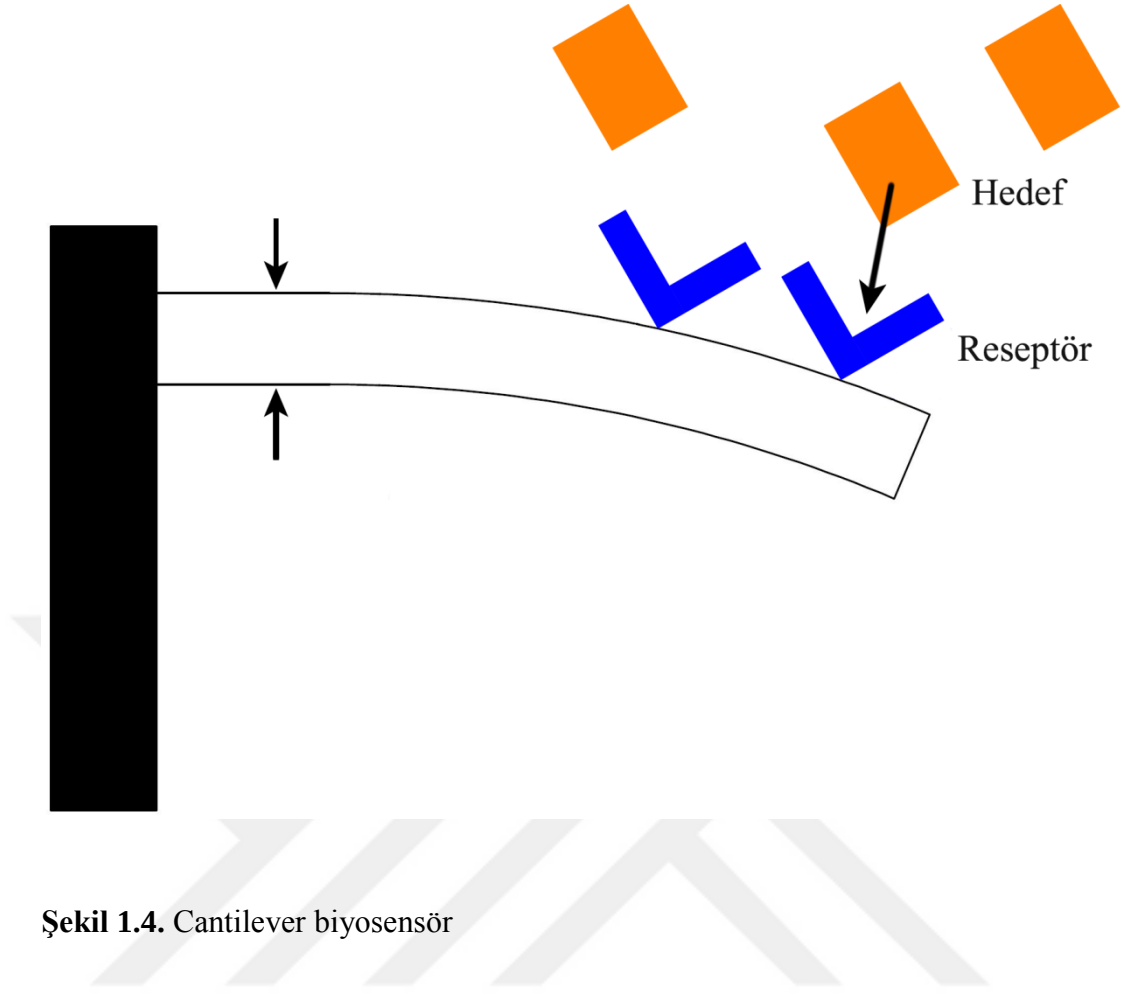
Biyosensörlerin diğer bir sınıflandırması ise, optik, elektriksel veya kütleli gibi algılama metotlarına göre kategorize edilmektedir. Işık saçılımı veya floresans bazlı algılama optik biyosensörler ile yapılmaktadır. En yaygın kullanılan optik biyosensör [5] olan akış sitometrisi Şekil 1.3.'de gösterilmiştir. Analizi yapılacak örnek (analit), lazer ışınlarının ve örnekten saçılan ışınları kaydeden detektörlerin bulunduğu alana

gönderilir. Detektörler tarafından sinyal değişimi algılanır ve örneğin belirlenmesi tamamlanır.



Şekil 1.3. Akış sitometrisi

Kütle algılama tespiti, kütle değişimine göre yapılmaktadır. Cantilever biyosensör birkaç molekül değişikliğine duyarlı olan en hassas ölçekli cihazdır [6]. Ölçülecek olan numune molekülleri cantilever yüzeye bağlandığı zaman, örneğin salınım frekansı değişmekte ve frekans dağılımına göre örneğin tespiti tamamlanmaktadır. Biyo algılama metoduna bağlı cantilever biyosensör şeması Şekil 1.4.'de gösterilmiştir. QCM (Kuartz kristal mikro denge) ise başka bir kütleyle duyarlı algılama metodudur. Antijen molekülleri fonksiyonel sensör yüzeyine taşınmaktadır ve bu moleküllerin varlığı kuartz alttaştaki rezonans frekansını değiştirmektedir. Bu frekans elektriksel bir ekipmanla belirlenmektedir [7].



Şekil 1.4. Cantilever biyosensör

Biyosensörler birçok farklı platformda kullanılmaktadır. İnsan sağlığının kontrolü bu sensörlere bağlıdır. Doktorlar doğru tedavi seçiminde biyosensörlerden faydalanırlar. Buna en iyi örneklerden birisi kardiyak troponin sensörüdür. Bu sensör kanda bulunan troponin hormon seviyesini ölçmektedir. Troponin hormonu seviyesinin artması kalp krizini tetiklemektedir [8]. Kardiyak troponin sensörü, Dünyadaki ölümlerin birincil nedeni olan kalp krizini önlemek için kullanılmaktadır. Elektrokimyasal testlere iyi bir örnek olan bu testte, spesifik troponin molekülleri fonksiyonel hale getirilmiş yüzeye bağlanır. Moleküllerin bağlanmasının ardından yüzeyin elektriksel özelliklerinin değişikliğine göre elektrokimyasal sinyaller elde edilir. Bu örnek aynı zamanda biyosensörlerin taşınabilirliği gibi bir ihtiyacı da ortaya çıkarmaktadır. Ultra hassas ve birçok parametre ölçen biyosensörlere sağlık merkezlerinde ihtiyaç duyulurken, tek parametrelili ve mobil biyosensörlere evlerde ve kırsal alanlarda ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tip biyo algılama yerinde hasta teşhisi (point-of-care POC) olarak adlandırılmaktadır.

Mikro akışkan sistemler; mühendislik, fizik, kimya, biyokimya, nanoteknoloji ve biyoteknolojiyi içeren multidisipliner bir alandır [9-11]. Bu alanda yapılan uygulamalarda mikron boyutunda sistemler tasarlanarak mikron hacmindeki sıvıların akışı sağlanmaktadır. Mikroakışkanlar, femtolitre gibi çok düşük miktarlardaki akışkanların manipülasyonuna olanak sağlamaktadır. Mikro akışkan teknolojisi, bazı fiziksel olguların ve öngörülerin incelenmesi, kimyasal ve biyolojik analiz, hasta başında ve hastaya özel teşhis, özel reaktörler ve lab on a chip gibi birçok uygulamanın yapılabilmesini sağlayan bir teknolojidir. Mikro sistemlerde biyoçipler kullanılarak biyoanaliz ve biyolojilama gibi pek çok pratik uygulama vardır. Yapılan araştırmalar sonucunda geliştirilen sistemlerde virüs saptanmasının hızlı ve bu virüslerin doğrudan analizi yapılabilir. Bu çalışmalar sayesinde, kısa bir süre içerisinde bu sistemlerin gelişerek artık doktor ofislerinde kullanılacak duruma gelmesi beklenmektedir.

1.1. Literatür Özeti

Mikroakışkan tek hücre analiz sistemleri tek hücrenin sayımı, ayrılması, sınıflandırılması, karakterize edilmesi ve tanımlanması gibi teknolojik çözümler sunmaktadır [12,13]. Yüksek hızdaki tek hücrelerin karakterize edilmesi için yeni yaklaşımlar sunan yüksek çıktılı tek hücre analiz sistemleri geliştirilmiştir. Akış sitometrisi, hücrelerin sayımı, sınıflandırılması ve tanımlanması için iyi bir tekniktir [14,15]. Elektrik empedans sitometrisi, parçacıkların dielektrik parametrelerinden elde edilen AC elektriksel özelliklerini ölçer. Biyolojik empedans ölçümleri üzerine ilk çalışmalar, kan hücrelerinin düşük ve yüksek frekanslardaki iletkenliğinin ölçülmesi ile 1910'lu yılların başlarında gerçekleştirilmiştir [16-18]. Curtis ve Cole ilk defa tek hücre ölçümlerini gerçekleştirmişlerdir [19].

Son zamanlarda mikroakışkan Coulter sayacının verimliliğini artırmaya yönelik çeşitli tasarımlar önerilmiştir. Mikroakışkan Coulter sayacının verimliliği çok kanallı yapılar dizayn edilerek geliştirilmiştir [20]. Ölçüm sisteminde elde edilen sinyali artırmak için kanal boyutlarının azaltılması tıkanma problemini meydana

getirmektedir. Mikro kanallardaki tıkanma problemini gidermek için iki boyutlu odaklama yapılmıştır [21].

Bir mikro-empedans akış sitometrisinde ilk tek hücre empedans ölçümü Ayliffe ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [22]. Gawad ve arkadaşları bir mikroakışkan sistemde mikro küreleri açık bir şekilde ayırt ettiklerini göstermişlerdir [23]. Bu çalışma iki hücre popülasyonunu ayırmayı göstermiş nicel analizin ilk ispatıdır. Böylece tek hücre empedans teknolojisinde önemli bir adım atılmıştır. Gawad ve arkadaşlarının önerdiği eş düzlemsel elektrot modeli birçok araştırmacı tarafından tek parçacık/hücre empedans algılama sistemleri için uyarlanmıştır [24-28].

Günümüzde birçok alanda biyosensör uygulamaları bulunmaktadır: Çevre uygulamaları, hava ve sudaki zararlı organizmaları tespit için kullanılır. Gıda uygulamaları, gıda izleme, gıda kaynaklı patojenleri tespit için kullanılır. Askeri uygulamalarda, biyolojik bir savaş tehdidinin tespitinde kullanılır. Sağlık uygulamaları, hastalıkların erken teşhis ve tedavisinde, takip edilmesinde kullanılır [29,30]. Sağlık uygulamaları arasında glikoz ölçüm sensörleri en iyi bilinen ticari örneklerden birisidir. Bu sensörler dünya nüfusunun % 1-2'sini oluşturan diyabet hastalarına büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Glikoz testi, glikoz içeren kandan gelen akımı ölçmektedir [31]. Kan glikozu, elektrotlara voltaj uygulanarak ölçülen akım değişimi ve kimyasal reaksiyonların gerçekleştiği birçok enzim tarafından azaltılmaktadır. Hamilelik testi ise ölçüm stratejisinde farklılık gösterir. Bu ölçüm metodu, örneğin alınmasında kâğıt tabanlı bir mikroakışkan teknik kullanılmaktadır. Aynı zamanda, reseptör antikorla fonksiyonel hale getirilen nano parçacıklardan oluşan bir sandviç analiz metodu kullanılmaktadır [32]. Bu test Human Chorionix Gonadotropin (HCG) olarak adlandırılan hamileliği belirleyici moleküllerin varlığını ölçmektedir.

1.2. Tezin Amacı

Ülkemiz ve dünyada her yıl milyonlarca insan patojen kaynaklı hastalıklara yakalanmaktadır. Bunların bir kısmı ölüm ile sonuçlanırken bir kısmı da uzun süreli tedaviler sonucunda düzelmektedir. Bu gibi olayların insanın yaşam kalitesini düşürmesi ve hayatını tehdit etmesi bir yana bırakılsa dahi patojenik hastalıklardan kaynaklı iş gücünün düşmesi ve bu hastalıkların tedavi masrafları dünya genelinde milyarlarca doları bulmaktadır. Bundan dolayı patojenlerin hızlı ve güvenilir şekilde tespit edilmesi için çeşitli yöntemler üzerinde çalışılmaktadır [33-37].

Bu çalışmada empedansa dayalı bir mikroakışkan sistem üretilecektir. Aynı zamanda mikroakışkan sistemlerin simülasyonu detaylı sonlu element metodu ile yapılacaktır. Böylece farklı boyutlardaki elektrot ve kanalların performansı deneysel ve teorik olarak incelenecektir. Deneysel ve teorik hesaplamalara göre uygun kanal ve elektrot geometrisinde farklı boyutlara sahip polistiren mikro kürelerin ayırt edilmesi hedeflenmektedir.

Bu tezde amaç kapasitif-impedimetrik biyosensörlerin araştırılması ve duyarlılık sınırlarının geliştirilmesi ile birlikte mikro akışkan sistemlerde kan hücresi tespiti yapabilmektir. Bunun başarılması halinde özelleşmiş kan hastalıklarının tespitine yönelik portatif sistemler geliştirilebilecektir. Bu sistemler sayesinde kalifiye eleman gerektiren, uzun ve pahalı olan geleneksel yöntemler yerine hızlı, güvenilir ve ekonomik bir yöntem bulunmuş olacaktır. Geleneksel yöntemlerde kan numunesinin incelenmesi, laboratuvar ortamında, uzman iş gücü ve uzun analiz süreçleri gerektirmektedir. Bu tez çalışmasında bunun yerine mikro elektrotlar üzerine entegre edilmiş mikro kanallar kullanılarak, kırmızı kan hücreleri, sensörün kapasitansında ya da empedansında yaptığı değişiklik gözlemlenerek kısa süre içerisinde tespit edilebilecektir. Bu açıdan tez çalışması, zaman, iş gücü ve maddi açıdan avantajlar sağlamaktadır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Mikroakışkanlar

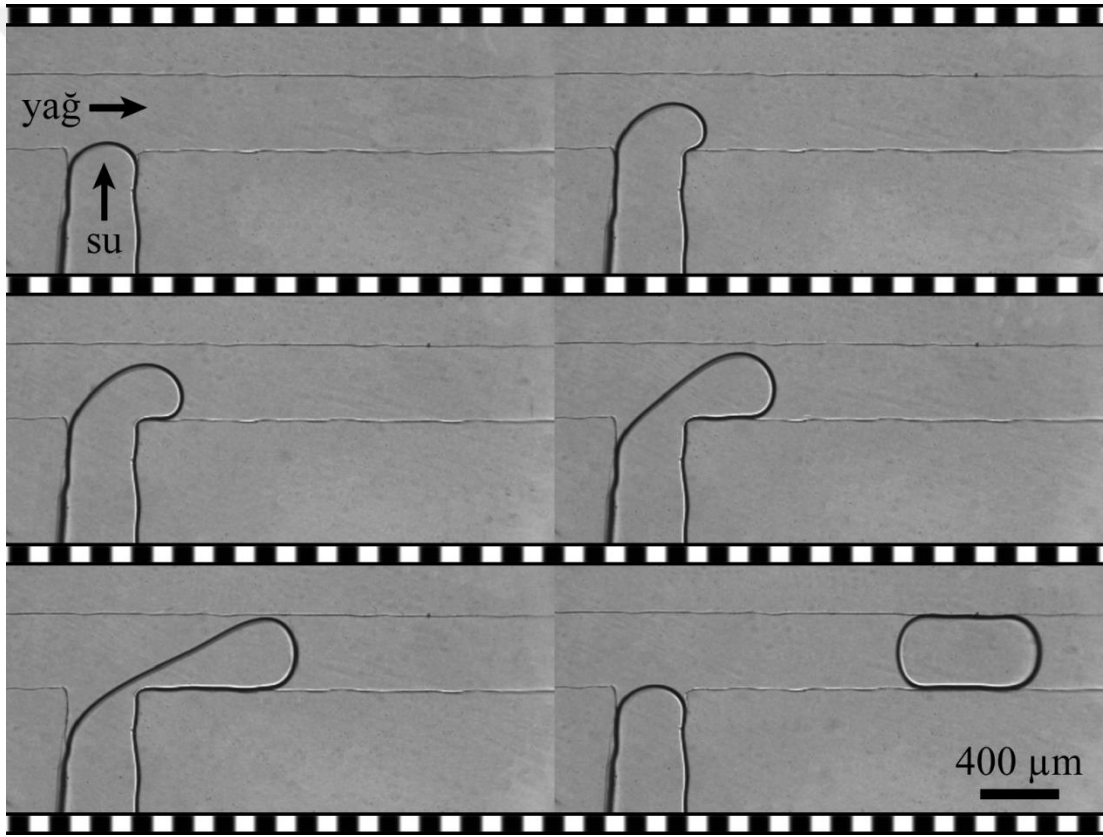
Mikroakışkan teknolojisi ilk olarak, moleküler analizde, küçültülmüş boyutlar sayesinde ayırma performansının iyileştirmesi amacıyla başlamış ve son yıllarda birçok disiplini etkileyen bir bilim alanı olmuştur. Mikroakışkan teknikler, kimya, biyoloji, genetik, eczacılık gibi alanlarda kullanılmakta olup, sahip olduğu avantajlar sayesinde standart metotların önüne geçmiştir.

Mikroakışkan araştırmanın kökleri mikro elektronik sanayisine kadar ulaşmaktadır. Araştırmacılar, analitik yöntemleri küçültecek olanaklar için çalışmalar yaparken, mikro elektronik teknolojisi, fotolitografi, aşındırma ve birleştirme tekniklerini kullanarak silikon temelli mikro işleme sürecini geliştirmişlerdir [38]. Biyoanalitik ve mikro elektronik disiplinlerinin birleşimi, mikroakışkanın doğuşu olarak ele alınabilir. Terry ve arkadaşlarının silikon plaka üzerinde küçük bir Gaz kromatografi hava çözümleyicisi yapımı ile ilk silikon temelli analiz sistemi üretilmiştir.

Araştırmacılar gaz ve sıvı kromatografide küçültmeye giderken, ilk başarılı mikroakışkan ayırma cihazları, kolonlara kolaylıkla elektriksel potansiyel uygulanabildiği için elektroforetik teknikleri kullanmıştır [39,40]. 1992 yılında Manz ve arkadaşları, ilk çip üzeri kılcal elektroforesizi göstererek bu alanda bir çığır açmışlardır [41]. Aynı yıl Mathies ve arkadaşları, mikroakışkan cihazlarda elektroforetik sıralamayı göstermiştir [42]. 1993 yılında Harrison ve arkadaşları, cam içerisinde mikro kılcal elektroforesizi sistemini göstermiştir. Bu sistem, 15 saniyede çok sayıda aminoasidi ayırtmıştır [43]. Sonraki yıl Wooley ve Mathies, mikroakışkan kılcal jel elektroforesizi sistemini küçültmeyi başarmıştır [44]. Bu sistem DNA analizinde ayırtmayı çok hızlandırmıştır.

90'lı yılların ortasında araştırmacılar, mikroakışkan teknolojisini ayırmadan başka uygulamalar için de kullanmaya başlamış ve bu yeni yeni cihazların geliştirilmesini

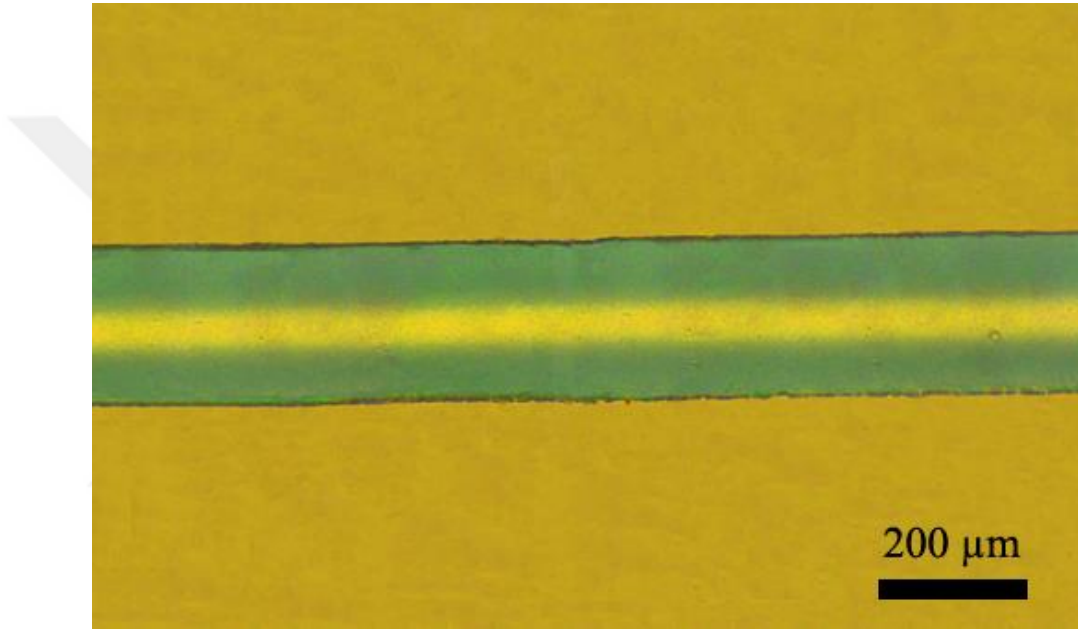
sağlamıştır. Bunlar arasında, PCR çipler [45], DNA çipleri [46] ve birçok kimyasal bileşiğin sentezi gösterilebilmektedir [47]. Tek hücre analizi, hücrelerin mikro kanallar içerisinde analiz edildiği ilgi çekici bir alandır [48]. Mikro damlacıkların kontrol edilmesinde kullanılan dijital mikroakışkanlar diğer bir uygulama alanıdır [49]. Damla temelli mikroakışkanların ilk kullanımı 80'li yıllardaki mürekkep püskürtmeli yazıcılardır. Günümüzde ise biyolojik uygulamalarda kullanılmaktadır [50]. Damla mikroakışkanlar [51,52] daha kolay manipülasyon ve daha iyi analiz için mikro parçacıkları tutmayı sağlar. Mikro damlacıkların oluşumu Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Mikro kanal içerisinde mikro damlacık oluşumu

Hayatımızın birer parçası olan tesisatlar, musluklar, borular ve bahçe hortumlarında suyun litrelercesini akarken görmeye alışkın olan bizler için, bu sistemlerin metrenin

milyonda birine inmesi çok büyük bir şaşkınlık yaratmayabilir. Ancak boyutlar küçüldükçe akışkanların değişen özellikleri, fiziksel yapının işlemlerine izin veriyor [53]. Şekil 2.2’de gösterildiği gibi, iki farklı sıvının birbirleri ile karışmadan laminar akış göstermesi en çok bilinen örneklerden birisidir. Burada mavi ve sarı sıvıların birbirleriyle karışmadan aktığı fakat difüzyona bağlı olarak karışmaya başladığı sınır bölgesinde yeşile dönmektedir. Karışma uzunluğu sıvıların hızı, viskoziteleri, difüzyon katsayıları gibi birçok parametreye bağlıdır [54].



Şekil 2.2. Laminer akış

Diğer akış tipi ise, günlük hayattan aşına olduğumuz turbulent akıştır. Laminer ve turbulent akışın kendilerine has özellikleri vardır. Bu akış türleri birçok fizik kuralı tarafından kontrol edilmektedir. Bu kurallar aynı kalmaktadır fakat akış özellikleri, birbirlerini etkileyen baskın kuvvetlerle viskoz veya atalet kuvvetlerine bağlıdır. Viskoz kuvvetler moleküller arası ve yüzey kuvvetlerinden, atalet kuvvetleri sıvının hızı ve kütlesiyle alakalı momentumdan kaynaklanmaktadır [54]. Belirtilen şartlara karşılık gelen Reynolds sayısı hesaplanarak sıvının akış tipi belirlenebilmektedir.

Reynolds sayısı Eşitlik 2.1’de gösterildiği gibi atalet kuvvetlerinin, viskoz kuvvetlerine oranıdır.

$$Re = \frac{vd}{\mu} \quad (2.1)$$

Burada v akım hızını, d kanal çapı ve μ ise kinematik viskoziteyi belirtmektedir. Reynolds sayısı 2000 den küçük olan sıvılar laminar, 2000 den büyük olan sıvılar turbulent özellik göstermektedir [55].

2.2. Mikroakışkan Empedans Sitometrisi

Mikroakışkan tek hücre analiz sistemleri tek hücrenin sayımı, tuzaklanması, odaklanması, ayrılması, sınıflandırılması, karakterize edilmesi ve tanımlanması için teknolojik çözümler gerektirir [12,13]. Hücrelerin büyük bir kısmının hacim yoğunluk ölçüleri ortalama bilgi sağlarken, şekil olarak aynı görünen tek hücreler genellikle heterojen bir tutuma sahiptir [56,57]. Bu yüzden yüksek hızdaki tek hücrelerinin büyük kısmının karakterize edilmesi için yeni yaklaşımlar sunan yüksek çıktılı tek hücre analiz metotları geliştirilmiştir. Akış sitometrisi, hücrelerin sayımı, tanımlanması ve sınıflandırılması için iyi bir tekniktir [14,15]. Modern ticari ışınımla aktive edilmiş hücre sınıflandırma cihazları saniyede binlerce hücre analizi yapabilir fakat genellikle küçük bir örnek hacminin kullanımı için uygun olmayan pahalı, komplike makinalardır. Lab on a chip teknolojileri hücre ölçümleri için yeni yaklaşımlar sunar [58-63]. Bu yeni teknolojiler yüksek hızda hücre manipülasyonu için geliştirilmektedir.

Tek hücreler, noninvaziv (müdahalesiz) ve etiketsiz elektriksel teknikler kullanılarak dielektrik özellikleri ve boyut farklılıklarına bağlı olarak tanımlanabilir. Biyolojik hücrelerin dielektrik özelliklerinin karakterizasyonu genellikle AC (alternatif akım) elektro kinetiği ve empedans spektroskopisi kullanılarak iki şekilde gerçekleştirilir. AC elektro kinetik teknikleri parçacıkların davranışları ve bir AC elektrik alanına

maruz bırakılan akışkanları araştırmak için kullanılır. Elektrik kuvvetleri, hem parçacıklara hem de içinde bulundukları sıvıya etki ederler. Dielektroforesizi [64-68], yürüyen dalga dielektroforesizi [69,70], elektro rotasyonu [71] ve elektro oryantasyonu [72] gibi olguların temelini oluştururlar.

Elektrik empedans spektroskopisi, parçacıkların dielektrik parametrelerinden elde edilen AC elektriksel özelliklerini ölçer. Biyolojik empedans ölçümleri üzerindeki ilk çalışmalar kan hücrelerinin düşük ve yüksek frekanstaki iletkenliğinin ölçüldüğü 1910'lu yıllara kadar uzanmaktadır [16-18]. 1920'lerde Fricke, Maxwell ilkelerini kullanarak elektriksel iletkenliği ve dağılım hücrelerinin bulunduğu çözeltideki hücre zarının kapasitesini hesaplamıştır [73-75]. Cole, süspansiyondaki tek kabuklu hücrenin kompleks empedansını elde etmek için Maxwell karışım denklemini kullanmıştır ve hücre zarının davranışını tanımlamak için Sabit Faz Açısı modelini önermiştir [76]. Tek hücre ölçümleri ilk defa Curtis ve Cole tarafından gerçekleştirilmiştir [19]. 1950'lerde kan hücrelerini sayan biyoteknolojik cihaz Coulter sayacı geliştirilmiştir. Bu cihaz, gönderilen tek hücrelerin içinden geçtiği küçük bir kanala DC voltaj uygular. Schwan biyolojik hücreler için üç büyük dielektrik dağılımını (α , β ve γ) tanımlayarak hücre empedans sitometrisi alanına öncülük etmiştir [77].

2.2.1. Mikroakışkan Coulter Sayacı

Coulter sayacı mikro parçacıkların geçtiği dar kanalın DC direncini denetler. Hücre zarı DC de bir yalıtkan katman olarak hareket ettiği için, hücre iletken sıvının yerini alarak bu kanalın direncini değiştirir. DC direnci hücrenin boyutu ile orantılıdır ve hücrenin içeriği ile ilgili bilgi verir. Çift sinyal analiz sistemleri ilk defa Hoffman tarafından geliştirilmiştir [78]. Bu sistemde DC ve yüksek frekanslı AC sinyali parçacıkların özelliklerinin ve boyutlarının anlaşılması için birlikte uygulanmaktadır. DC sinyalleri parçacık boyutu hakkında bilgi verir. AC sinyalleri ise parçacığın iletkenliği hakkında bilgi verir.

Coulter sayacında, sinyal parçacık boyutu ile doğru orantılı ancak kanal boyutu ile ters orantılıdır. Bu durum mikro üretim tekniklerini avantajlı hale getirmektedir. İlk olarak, Coulter sayacı kuartz alttaşı üzerine mikro fabrikasyon teknikleri kullanılarak 2001 yılında üretilmiştir [79]. Son zamanlarda mikro akışkan Coulter sayacının performansını artırmaya yönelik çeşitli tasarımlar önerilmiştir. Mikroakışkan Coulter sayacının performansı çok kanallı yapılar dizayn edilerek geliştirilmiştir [20]. Sinyali artırmak için boyutların azaltılması tıkanma problemini meydana getirmektedir. Kanallarda tıkanma problemini gidermek için iki boyutlu odaklama (sheath flow focusing) yapılmıştır [21]. Boyutların azaltılması aynı zamanda analiz esnasında akış hızının artmasına neden olmaktadır. Bu yüzden ölçüm hızını artırmak için paralel kanallarda çoklu elektrotlar kullanılmıştır [24].

Mikroakışkan Coulter sayacındaki zorluklardan birisi elektrot malzemesinin seçimidir. Standart Coulter sayıcılarda kullanılan Ag/AgCl polarize olmayan elektrotlar uygun tercihtir. Ancak bu elektrotları kanallara entegre etmek zordur ve elektrotların ömürleri sınırlıdır [80,81]. Diğer metal elektrotlar kanallara daha kolay entegre edilebilir. Ancak genellikle kapasitif olan ve elektrotlarla sıvı arasındaki yüzeyde oluşan elektriksel çift katman (EDL) DC sinyal uygulama konusunda problem oluşturur. EDL, kapasitif davranışından dolayı özellikle düşük frekanslarda çok baskındır. Frekans arttıkça, EDL'nin empedansı azalır ve çözeltiye daha fazla voltaj ulaşır. Diğer durumda voltaj, analizin yapıldığı yerdeki çözeltiye ulaşmadan EDL'ye ulaşır. Elektriksel çift katman etkisini azaltmaya yönelik olan yöntemler yüzey alanını artırmak [82] ve polielektrolitik tuz köprülerinden (PSBEs) [83] veya polielektrolitik jel elektrotlarından (PGE) [84] yararlanmayı içerir. Bir DC empedans bazlı mikrositometre cihazı PGE ile entegre edilerek dolaşımdaki tümör hücrelerinin (CTC: Circulating Tumor Cells) tespiti için geliştirilmiştir. CTC'ler meme kanseri hastalıklarının kan örneklerinde başarılı bir şekilde test edilmiştir [85]. Bazı özel durumları hesaba katarak oluşturulan elektrot dizaynının yanı sıra, konvansiyonel Coulter sayaçlarında parçacıkların hacmini ölçmede kullanılan model, mikroakışkan Coulter sayaçlarına direkt olarak uygulanabilir değildir. Bunun nedeni farklı elektrot konfigürasyonları ve kanal geometrileridir [79,86]. Mikroakışkan Coulter sayacı hücreleri sayma ve boyut analizlerinde sınırlıdır. Elektriksel özelliklerinin karakterizasyonunda ise yeterli değildir. Coulter sayaçları, elektriksel empedansı

medikal test uygulaması olarak kullanırlar ama hücrelerin bilimsel analizinde kullanmazlar.

2.2.2. Empedans Akış Sitometrisi

Empedans akış sitometrisi mikro Coulter sayacının geliştirilmiş tekniğidir. Coulter sayacı klinik aygıtlarda (hematoloji analizörü gibi) geniş bir şekilde kullanılan teknik haline gelmesine rağmen konvansiyonel Coulter sayacı sadece boyut (hacim) farklılıklarına sahip hücre türlerini sınıflandırabilmektedir. Empedans akış sitometrisi ise hücre boyut farklılıklarına göre sınıflandırmasının yanısıra hücreleri analiz etmek içinde kullanılmaktadır [23,87-90]. Bir mikro-empedans akış sitometrisinde ilk tek hücre empedans ölçümü Ayliffe ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [22]. Bu çalışmada kullanılan çip, cam alttaş üzerine kaplanan altın elektrotları ile SU8 fotorezisti kullanılarak elde edilen kanalların entegre edilmesiyle üretilmiştir. Elde edilen bu mikroakışkan sistemde insan polimorfonükleer akyuvarlarının (PMNs) ve balık kırmızı kan hücrelerinin (RBCs) kHz ve MHz mertebelerindeki farklı frekans değerlerinde empedans spektrumları ölçülmüştür.

Fuller ve arkadaşları, çoklu frekanslardaki empedans ölçümleri ile periferik kan granülositleri karakterize etmişler ve zar kapasitansını, yarıçapını, sitoplazma iletkenliğini ölçmüşlerdir [91]. Sohn ve arkadaşları, kapasitans sitometrisini geliştirmişlerdir ve sabit ökaryotik hücrelerin DNA içeriğini ölçtüklerini iddia etmişlerdir [92]. Bir çift altın elektrot üzerine polidimetilsiloksan (PDMS) mikro kanalı entegre edilmiştir. Coulter sayacı gibi hücre boyutu 1 kHz frekansında bir direnç köprüsü kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar bir hücrenin DNA içeriği (hücre hacmindeki değişim) ve kapasitansı arasındaki doğrusal bir bağ olduğunu göstermiştir.

Gawad ve arkadaşları mikro küreleri açık bir şekilde ayırt ettiklerini göstererek tek hücre empedans teknolojisinde önemli bir adım atmışlardır [23]. İnce film mikro elektrotlar üzerine mikro kanal entegre ederek empedans sitometrisinde modern bir

mikroakışkan çip üretmişlerdir. Düşük ve yüksek frekanslardaki empedans ölçümü için Lock-in amplifier kullanmışlardır. Mikro elektrot çiftlerini, tek bir hücreden gelen empedans sinyalini belirlemek için hücre ile aynı boyutlarda üretmişlerdir. Elektrotlar kanal içerisinde düzensiz bir elektrik alanı meydana getirirken bir ya da daha fazla aralıklı frekanslarda voltaj ile güç verilir. Bir elektrot çifti hücreden kaynaklanan elektrik alan dalgalanmasını ölçerken, diğer elektrot çifti ortamın elektrik akımını referans olarak kaydeder. İki algılama hacminden gelen elektrik akımı empedans amplifier kullanılarak voltaj sinyaline dönüştürülür. Daha sonra diferansiyel amplifier iki sinyal arasındaki farkı çıkarır. Lock-in amplifier uyarıcı frekanslarda iç faz ve dış faz empedans sinyallerini ölçmek için kullanılır. Empedanstaki diferansiyel değişim çift sinyal olarak ölçülür. Bu çalışma iki hücre popülasyonunu ayırmayı göstermiş nicel analizin ilk ispatıdır. Gawad ve arkadaşlarının önermiş olduğu eş düzlemsel elektrot modeli birçok araştırmacı tarafından tek parçacık/hücre empedans algılama için kullanılmış ve uyarlanmıştır [26,28,93-95]. Bu çalışmalardan bazıları hem optik hem de elektriksel sistemlere uygulanabilen hibrit sistemlerdir [90]. Bazı çalışmalarda ise dielektroforezis (DEP) gibi parçacık tespitinden önce farklı parçacıklar ayrıştırılmıştır [96].

Eş düzlemsel mikro elektrotlardan kaynaklanan homojen olmayan elektrik alan dağılımı empedanstaki varyasyonlar üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Kanaldaki farklı pozisyonlarda akan aynı boyuta sahip parçacıklar farklı elektrik alan kuvvetiyle karşılaşır ve farklı bir empedans sinyali meydana getirir. Gawad elektrik alan hesaplaması için çift paralel elektrot yüzeylerinin 3 boyutlu sonlu eleman modellemesini (Finite Element Modeling-FEM) yapmış ve Maxwell'in karışım denklemi ile sayısal çözümlerini karşılaştırmıştır [97]. Linderholm [98,99] ve Sun [100] hem eş düzlemsel hem de paralel elektrot dizaynlarının elektrik alan dağılımının analitik çözümü için uyumlu haritalama metodunu kullanmışlardır. Parçacık pozisyonunun kontrolü paralel elektrot yapıdan daha çok eş düzlemsel dizayn için önemli olduğunu göstermişlerdir.

Cheung ve arkadaşları paralel elektrot dizaynı ile ürettikleri çipi kullanarak kırmızı kan hücrelerinin dielektrik özelliklerini ölçmüşlerdir [88]. Glüturaldehit kullanılarak sabitleştirilmiş (durağan) membran proteinlerinin olduğu alyuvar hücreleri ile

alyuvar zarı arasındaki farkı kıyaslamışlardır. Sabitlenmiş hücre zarlı alyuvarların opaklığı normal alyuvarlardan önemli ölçüde farklı olduğunu göstermişlerdir. Benzer bir sistem çeşitli hücre tiplerini ayırmak için Kampmann ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır [101].

Hidrodinamik odaklama teknikleri mikroakışkan sistemlerin hassasiyetini artırmak için kullanılmıştır. Rodriguez-Trujillo ve arkadaşları parçacıkları empedans algılama bölgesine odaklamak için sheath flow tekniğini kullanmışlardır [102,103]. İki boyutlu odaklamayı, kanal girişinin merkezine ek olarak bir giriş deliği daha açarak yapmışlardır. Bu tasarım sayesinde parçacıklar elektrik alan çizgilerinin yoğun olduğu elektrotlara doğru itilerek odaklanmıştır. Sheath flow ile sıvıların akış oranları ayarlanarak hem yatay hem de dikey yönlerde odaklama yapılabilir. Rodriguez-Trujillo ve arkadaşlarının sistemine benzer bir odaklama stratejisi, Watkins ve arkadaşları tarafından elektrotlara yakın bir şekilde tek sıra halinde hücrelerin akışını sağlamak için geliştirilmiştir [104].

2.2.3. Mikro Elektriksel Empedans Spektroskopisi

Mikro elektriksel empedans spektroskopisi (m-EIS), yakalanmış bir hücreye frekansa bağlı bir uyarı sinyali uygulayan ve bu yolla oluşan akımı ölçen bir tekniktir. Mikro fabrikasyonla üretilen elektrotları kullanan çeşitli hücre yakalama/tutma mekanizmaları önerilmiştir. Bunlardan bazıları, hidrodinamik yakalama/tutma, [105,106] negatif basınçlı yakalama/tutma [107,108] ve DEP yakalama/tutmadır [109]. Sürekli akış sistemlerinin aksine, kültür içerisindeki tek hücrelerin uzun süreli gözlemlenmesi gerekir. Mikroakışkan cihaz içerisinde çok sayıda hücrenin yakalanmasında ve kinetik analizini yapmada kullanılan “hidrodinamik hücre tutma” tek hücre analiz teknolojisine iyi bir örnektir [110,111]. Hidrodinamik hücre tutma ve tek hücre empedans analizinin birleşimi, farklı boyutlarda etiket yapma gereği duymayan hücre analiz sistemlerinin oluşumunu sağlar. Jang ve arkadaşları, kanallar içerisinde mikro sütunlar bulunan bir mikroakışkan cihaz geliştirilmiştir [105]. Bu cihaz, fiziksel olarak hücreyi tutar ve elektriksel empedans spektroskopisini kullanarak hücrenin empedansını ölçer. Burada, iki elektrot çiftinde (biri referans

elektrotu ve diğesinde hücre bulunur) oluşan akıma bakarak empedans ölçümü yapılmaktadır. Bu çalışmada, yüzey aktif maddesinin ve toksinlerin hücre üzerindeki etkisi sürekli olarak gözlemlenmiştir. Cho ve arkadaşları, kaçak akımı azaltmak için düzlemsel mikro delikler geliştirmiştir [112]. Bunlar, hücrenin yerlerini belirler ve hücre ile elektrot arasına direk bir dokunuş sağlar. Li ve arkadaşları, mikron mertebesinin altında elektrotlarla birlikte bulunan açıklıklar kullanmışlardır [113]. Tek hücreler, dikeysel deliklerin üzerine kültürlenebildikleri için, tek hücrenin elektriksel özelliklerindeki hızlı değişiminin gözlemleniyor olması bu teknik için artı bir değerdir [107,114].

Mikro elektriksel empedans spektroskopisi tekniğinin iki büyük dezavantajı vardır. Birincisi, yakalama ve serbest bırakma süreci zaman aldığı için, mikro elektriksel empedans spektroskopisinin verimliliği düşüktür. İkincisi, test edilen hücrelerin kapasitansı ve direnci elektriksel modellerle empedans spektrumu yorumlanıp belirlenebilmektedir. Ancak bu parametreler elektrot boyutundan, hücreyi tutan mekanizmadan, hücre hacminden ve diğer hücreler ile olan etkileşimden büyük oranda etkilenmektedir.

2.2.4. Tıbbi Tedavi ve Tanı Uygulamaları

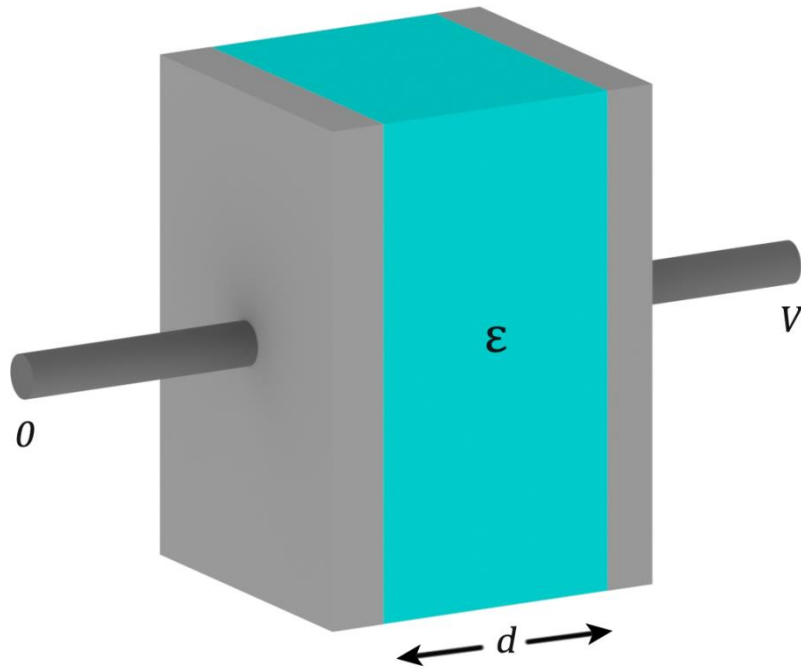
Tek hücre empedans analiz yöntemleri son zamanlarda biyomedikal, kliniksel ve hasta başında tanı uygulamaları için geliştirilmiştir. Mishra ve arkadaşları, CD4+ hücrelerini yakalamak için proteinle kaplanmış mikro elektrotları kullanmışlardır [115]. Tek hücre hassasiyetini gösterememelerine rağmen çok sayıda yakalanmış CD4+ hücreleri ve ölçülen empedans arasında doğrusal bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. HIV/AIDS ile mücadele eden hastalarda CD4+ hücrelerinin teşhisi için düşük maliyetli sistem geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Cheng ve arkadaşları, empedans değişiklikleri ölçülerek hücrelerin teşhisinin yapıldığı sistemlerde elektrot desenlerinin çeşitli tasarımlarını kullanmışlardır [116]. Tek hücre hassasiyeti optik tespit ile birlikte saflaştırılmış akyuvarları saymayı başaran ve mikroakışkan çipin içerisine bir metal oksit yarıiletken alan etkili transistör (MOSFET) entegre eden

Wang ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir [117]. Bu düzenek HIV virüsünün tanı ve tedavi fiyatını düşürme potansiyeline sahiptir.

Bu tez çalışmasında empedansa dayalı bir mikroakışkan sistem üretilmiştir. Üretilen bu sistemden mikro parçacık taşıyan bir sıvı geçirilerek, sıvı içerisindeki mikro parçacıklar sayılmıştır. Bu yöntem ile sistemin hassasiyeti ve veri toplama hızı artırılarak farklı boyutlara sahip parçacıklar ayırt edilmiştir. Bu şekilde kurulan mikroakışkan sistem yardımı ile alınan bir kan örneğindeki kırmızı kan hücreleri sayılmış ve kan örneğindeki farklı (zararlı) mikro parçacıklar tespit edilmiştir.

2.3. Dielektrik Parçacıkların Elektriksel Tespiti

Analiz edilecek malzemenin elektriksel geçirgenliğine ve direncine bağlı olarak verdiği impedimetrik tepkileri temel alan empedans spektroskopisi, malzeme ile ilgili bir bakış açısı kazandırır.



Şekil 2.3. Levhalar arası dielektrik materyal ile dolu paralel levha kapasitörü

Empedans, malzemenin uygulanan AC voltaja ve onun bir fonksiyonu olan frekansa vermiş olduğu tepkinin ölçüsüdür. Empedans kısaca voltajın akıma oranı olarak da tanımlanabilir. Voltaj, dielektrik çözeltisi ile doldurulmuş elektrotlar arasındaki bölgeye uygulanır. En basit şekilde paralel levha kapasitörü Şekil 2.3.'de gösterilmiştir.

Burada levhalar arasındaki alan hava, su ya da bunun gibi bir dielektrik materyal ile doldurulur ve bu elementlerin empedansı Eşitlik 2.2 ile verilir.

$$Z = -\frac{i}{\omega C} \quad (2.2)$$

Burada ω açısal frekans ve C ise kapasitansdır. Paralel levha kapasitörün kapasitansı Eşitlik 2.3'de verilen formül ile hesaplanır.

$$C = \epsilon \frac{A}{d} \quad (2.3)$$

Burada A levhaların alanıdır, d levhalar arası mesafedir ve ϵ ise dielektrik materyalin elektriksel geçirgenliğidir. Materyal yüksek oranda yalıtkan olduğunda elektriksel geçirgenliği, $\epsilon = \epsilon_r \epsilon_0$ dır. Materyal iletkenlik kazanmaya başladığında elektriksel geçirgenliği, frekansa bağlı farklılıklar göstermeye başlar.

İletken dielektrik malzemenin ihtiyaçlarını gidermek için, elektriksel akımın akmasını sağlayan ekstra parçalar gerekir. Bu yüzden, bir direnç kondansatöre paralel bağlanır. Burada dielektriğin kapasitif kısmı kondansatör ile, reaktif kısmı ise direnç ile gösterilir. Bu yüzden empedans Eşitlik 2.5 deki gibi verilir.

$$\frac{1}{Z} = -\frac{1}{\frac{i}{\omega C}} + \frac{1}{R} = \frac{R}{1+i\omega RC} \quad (2.4)$$

$$Z = \frac{R}{1 + i\omega RC} \quad (2.5)$$

Kapasitör ve direnç eşdeğerleri Eşitlik 2.5’de yerine koyulursa,

$$Z = \frac{\frac{d}{\sigma A}}{1 + i\omega \frac{d\epsilon A}{\sigma A d}} \quad (2.6)$$

Eğer paralel levha kapasitörü, empedans eşitliğinin sol tarafa yazılırsa, eşitliğin sağ tarafı tekrar düzenlendikten sonra Eşitlik 2.7 elde edilir.

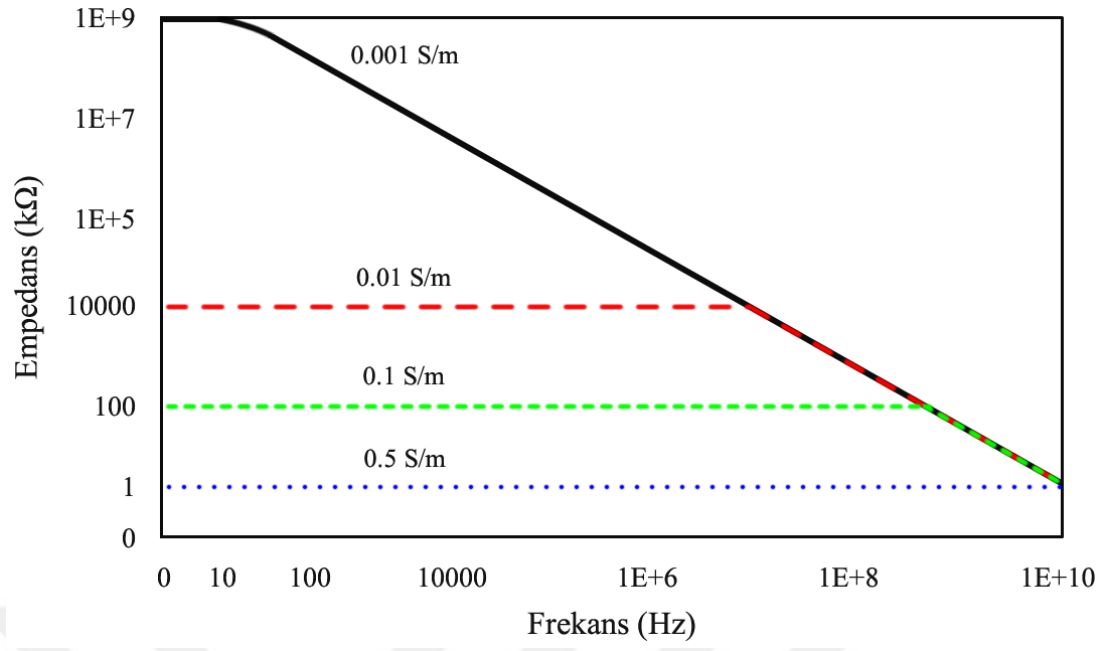
$$\frac{1}{i\omega C} = \frac{1}{i\omega(\epsilon - \frac{\sigma}{\omega}) \frac{A}{d}} \quad (2.7)$$

Eşitlik 2.8’de gösterildiği gibi elektriksel iletkenlik, frekansa bağlı ve iletkenlik sabiti içeren yeni bir forma sahip olur.

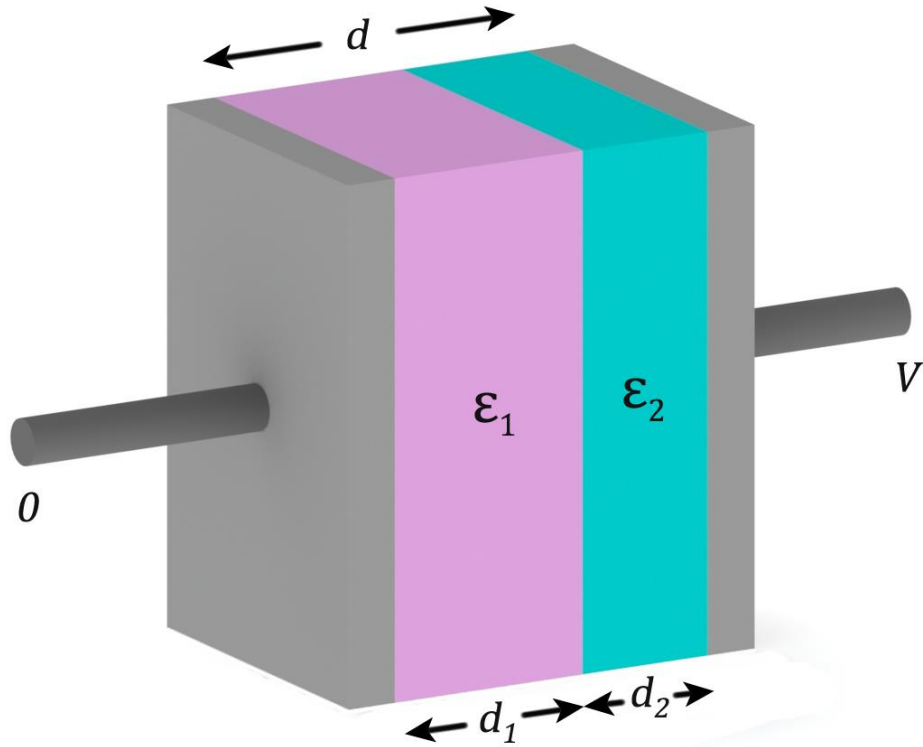
$$\epsilon^* = (\epsilon - i \frac{\sigma}{\omega}) \quad (2.8)$$

İletkenlik kazanan bir dielektrik materyal gevşeme gibi ilginç davranışlar gösterir. İletkenliğin artmasının empedans üzerindeki etkisi Şekil 2.4.’de verilmiştir.

İletkenlik arttıkça sonuçlar $1/\omega C$ den sapmaya başlıyor. Bu tez çalışmasının konsepti en az iki dielektrik materyalini birlikte içeriyor. Bunun en basit versiyonu Şekil 2.5.’de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. İletkenliğin empedans üzerindeki etkisi



Şekil 2.5. İki farklı dielektrik katmana sahip paralel levha kapasitörü

İki farklı dielektrik katmanına sahip paralel levha kapasitörü, paralel bir kapasitörü ve direncin dielektrik katmana uyumlu olduğu aynı yöntem ile modellenir. Bundan dolayı empedans:

$$Z = Z_1 + Z_2 = \frac{R_1}{1 + i\omega R_1 C_1} + \frac{R_2}{1 + \omega R_2 C_2} \quad (2.9)$$

$$\varepsilon^* = \varepsilon' - i\varepsilon'' = \varepsilon_0 \left[\varepsilon_{hf} + \frac{\varepsilon_{lf} - \varepsilon_{hf}}{1 + \omega^2 \tau^2} \right] - i\varepsilon_0 \left[\frac{\varepsilon_{lf} - \varepsilon_{hf}}{1 + \omega^2 \tau^2} + \frac{\sigma}{\varepsilon_0 \omega} \right] \quad (2.10)$$

Burada ε_{lf} ve ε_{hf} dielektrik katmanlarına ait parametrelerle yazılabilen dielektriksel geçirgenliğin alçak ve yüksek frekans limitleri anlamına gelmektedir.

2.4. Cmsol Multiphysics

Cmsol Multiphysics, sonlu elemanlar metodu (FEM) ile matematiksel eşitlikleri çözen bir yazılımdır. Sistem geometrisi fiziksel olarak uygun bir şekilde çizdirilir ve çözülür. Cmsol Multiphysics elektrik ve manyetik modunda, Maxwell denklemini uygun sınır şartları altında çözer. Maxwell denklemini çözmek için analitik metotlar yerine numerik metotları kullanır. Örneğin, bir fonksiyonun türevini almak için bazı kurallar uygulanır. Şimdi hem analitik hem de numerik metotların her ikisi ile bir fonksiyonun türevini alalım. $f(x) = x^3$ olarak tanımlanmış bir fonksiyon, bu fonksiyonun ilk türevi $f(x) = 3x^2$ dir. Fonksiyonun ilk türevinin değeri 2 noktasında 12 dir. Bu sonuç, fonksiyonun ilk türevinin analitik metot ile elde edilmiş çözümüdür. Şimdi numerik metotla bu fonksiyonun türevini bulalım. Türevin tanımı Eşitlik 2.11’de gösterildiği gibi verilir.

$$\frac{df}{dx} = \lim_{\Delta x \rightarrow 0} \frac{f(x + \Delta x) - f(x)}{\Delta x} \quad (2.11)$$

Bu eşitlik $x=2$ olan tüm işlemler için Eşitlik 2.12’de gösterildiği gibi numerik olarak uygulanabilir.

$$\frac{f(3) - f(2)}{3 - 2} = \frac{27 - 8}{1} = 19 \quad (2.12)$$

Δx daha fazla minimize edilirse,

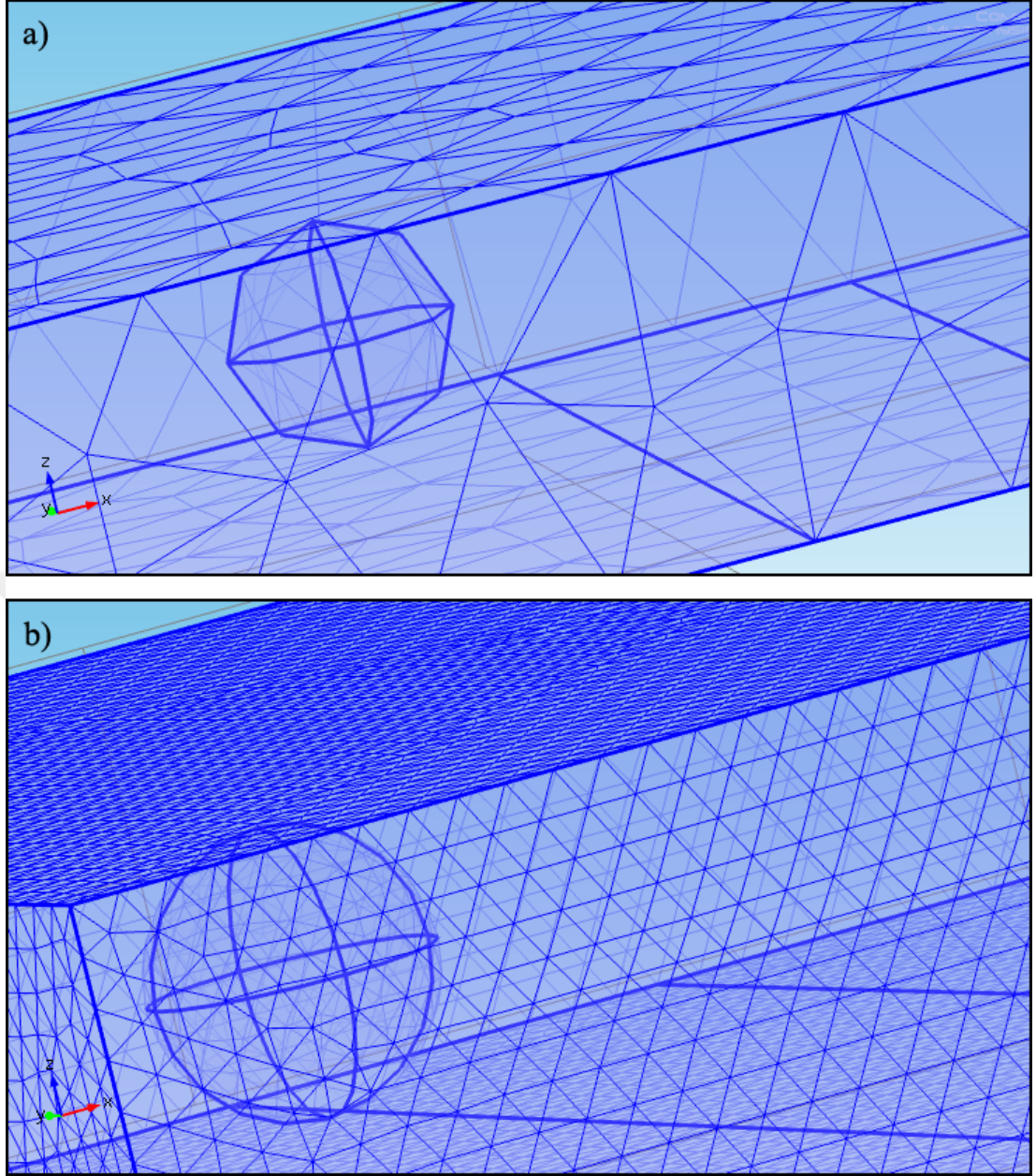
$$\frac{f(2.5) - f(2)}{2.5 - 2} = \frac{15.625 - 8}{0.5} = 15.25 \quad (2.13)$$

$$\frac{f(2.1) - f(2)}{2.1 - 2} = \frac{9.261 - 8}{0.1} = 12.61 \quad (2.14)$$

Burada görülmektedir ki fark azaldıkça, sonuç reel değere yaklaşır. Diferansiyel denklem formunda bu yaklaşım noktaları mesh noktaları olarak adlandırılır. Bu noktalar birbirine yakın olduğu sürece, sonuçlar, reel analitik sonuca yaklaşır.

Eşitlik 2.13 ve 2.14, x eksenindeki değişikliğin sıfıra yaklaştığında sonuçların reel değere ulaştığını ispatlamaktadır. Aslında hesaplama zamanından dolayı meshing bölgesini sıfıra getirmek imkânsızdır. Comsol Multiphysics’de bir geometrinin meshing Şekil 2.6.’da gösterilmiştir. Şekil 2.6.b. 6 μm çapında küresel bir parçacığı göstermektedir.

Şekil 2.6.’da görüldüğü gibi meshing boyutu geometriyi önemli derecede etkilemektedir. Mesh noktaları birbirine yakın olduğu zaman geometrik yapı daha gerçekçi gözükür. Bu nedenle Comsol Multiphysics, sınırlardan başlayarak mesh noktalarına kadar Laplace denkleminin çözüldüğü fiziksel sonuçları ayrıca etkilemektedir. Bu çalışmada simülasyon hesaplamalarında Comsol Multiphysics 4.3’ün AC/DC modülünün altında yer alan “Electric Current” programı 2D olarak kullanılmıştır. Ortam iletkenliği 2.5 S/m, ortamın dielektrik sabiti $80\epsilon_0$, parçacık iletkenliği 0.00001 S/m ve parçacığın dielektrik sabiti $2.6\epsilon_0$ olarak ayarlanmıştır. Aynı zamanda simülasyon hesaplamalarında en sık mesh yapısı kullanılmıştır.



Şekil 2.6. Farklı boyutlara sahip meshing a) $1\ \mu\text{m}$ b) $6\ \mu\text{m}$

2.5. Deneyisel Materyal ve Yöntem

2.5.1. Isısal Buharlaştırma Sistemi

Isısal buharlaştırma yöntemi metal kaplama sistemleri içerisinde en çok kullanılan tekniklerden birisidir. Bu yöntem, katı bir metalin rezistif olarak ısıtılması sonucu buharlaştırılarak, serin bir yüzey üzerinde biriktirilmesiyle oluşur. Alttaş, kaplama esnasında sabit bir hızda döndürülerek eşit dağılım sağlanabilmektedir. Isıtma işlemi tekne ya da pota şeklinde metal bir malzemenin üzerinden yüksek akım geçirilerek oluşturulmaktadır. Pota kısmına kaplanmak istenen metal malzeme yerleştirilir ve malzemenin ısıtılması bu şekilde sağlanır. Bu pota kaplanacak metal malzemenin buharlaşma sıcaklığına göre seçilmektedir. Metal malzeme buharlaştıktan sonra yüzeye yapışana kadar ortamdaki gaz molekülleriyle çarpışmalara uğrar. Bu çarpışmalar sonucunda bir kısmı saçılmalara uğrayarak kaplanmak istenen yüzeye ulaşamaz. 20 °C de hava için ortalama serbest yol, sırasıyla 1e-4 ve 1 e-6 Tor basınçlarda 45 ve 4500 cm'dir. Bu nedenle vakum odasındaki kaynak ile alttaş arasındaki 10-50 cm mesafe boyunca metal buharının düz bir şekilde giderek yüzeye yapışabilmesi için 1e-5 Tor'dan daha düşük bir basınçta çalışmak gerekmektedir. Kaliteli bir kaplama için vakum önemli bir ön şarttır. Bu tez çalışmasında metal kaplama işlemlerinde Vaksis PVD Vapor-3S Isısal buharlaştırma ile kaplama cihazı kullanılmıştır (Şekil 2.7.). Bu cihazda kaplanan metalin kalınlığını ölçmek için kristal dedektör yerleştirilmiştir ve cihazın dış kısmında bu dedektöre ait kaplanan metal malzemenin kalınlığını gösteren monitör bulunmaktadır. Kaplanan metal malzemenin kalınlığının izlenmesi için kullanılan kristal dedektör ile alttaş arasında yatay mesafe olduğu için bu iki yüzeyde biriktirilen metal miktarlarının oranı belirlenmelidir. Bu oran “Referans Faktörü (Tooling Factor)” olarak adlandırılmıştır. Çizelge 2.1.'de altın ve krom malzemelerine ait referans faktörleri verilmiştir [118].



Şekil 2.7. Isısal buharlaştırma sistemi (UNAM-Vaksis PVD Vapor – 3S)

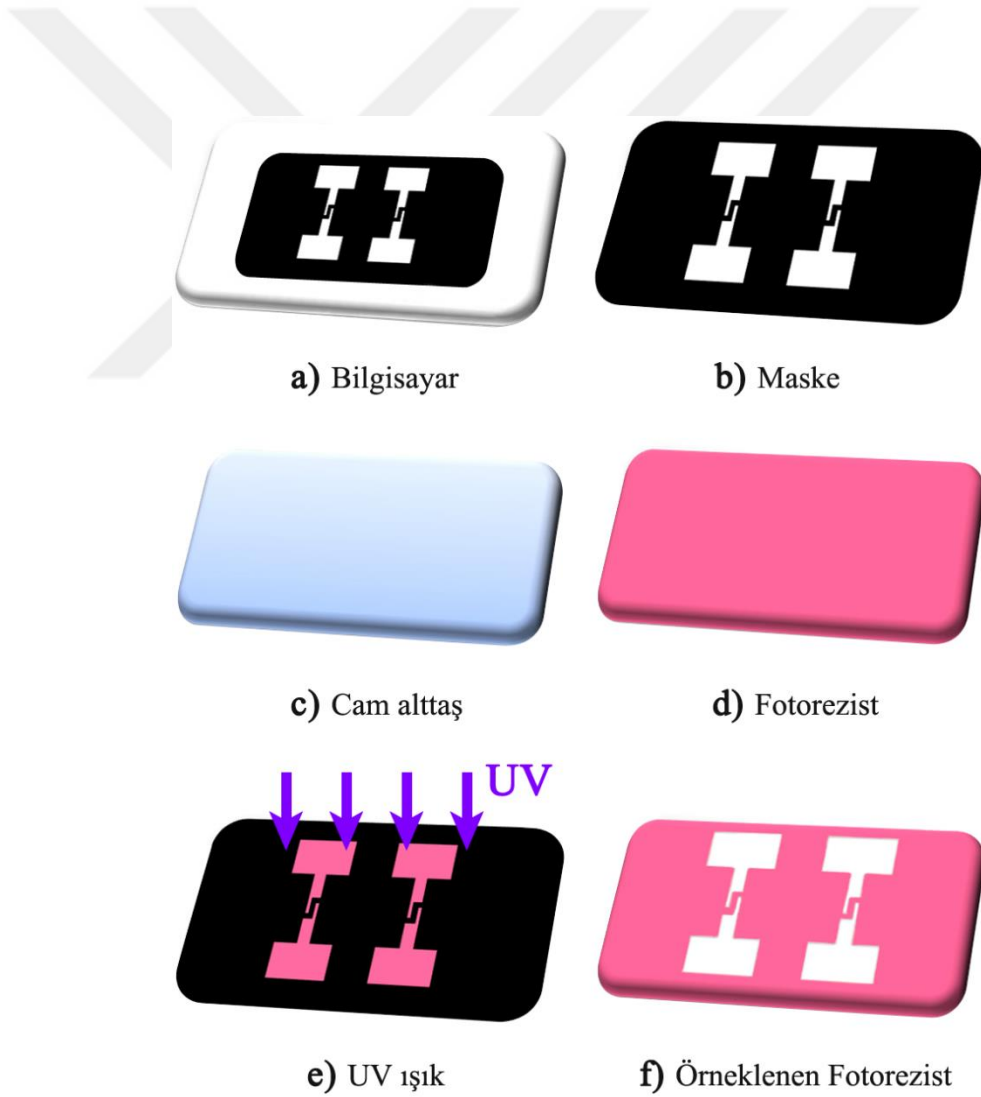
Çizelge 2.1. Altın ve krom metallerine ait referans faktörleri

Metal	Yoğunluk (g/cm ³)	Akustik Empedans	Referans Faktörü
Au	19.30	23.17	52
Cr	7.20	28.95	65

2.5.2. Fotolitografi

Bu çalışmadaki sensörler ve mikro kanallar fotolitografi yöntemi ile üretildi. Fotolitografi, tasarımcı tarafından belirlenen bir kalıbın materyal üzerine aktarılmasında kullanılan bir tekniktir [119]. Fotolitografi, 10 nm’lik çözünürlüğe kadar inmeye imkân veren bir yöntemdir. Çözünürlük, kullanılan mikro-işleme yöntemlerine göre değişmektedir. Fotolitografi, kendiliğinden oluşan tek katman, lazerle kesme gibi birçok mikro-işleme yöntemi bulunmaktadır [120]. Bu çalışmada 1 µm’lik çözünürlüğe sahip UV fotolitografi yöntemi kullanıldı (Şekil 2.8.). Bunun için bir bilgisayar programı (CAD, Layout Editor) ile örneklenmek istenen şekil

izilir (ekil 2.8.a.). Çizilen rnek bir maske yazıcı cihazı ile maske üzerine aktarılır (ekil 2.8.b.). Maske, cam levhadan yapılmıştır ve yüzeyinde, istenilen şekli taşıyan ışıkla tanımlanabilir opak bir ince katman (krom) bulunur. Maske hazırlandıktan sonra alttaş (ekil 2.8.c.), ışığa duyarlı organik bir polimer ile kaplanır (ekil 2.8.d.). Alttaş ile maske birleştirilir ve UV ışığa maruz bırakılır (ekil 2.8.e.). Maskenin şeffaf kısımları altındaki ışığa duyarlı polimer, nerek çözelti haline geçer. Bu kabartma şekil pozitif fotorezist olarak bilinir. Alttaş ile foto maske ayrılarak alttaş üzerinde kalan çözelti banyolama işlemi sonrasında ortamdan uzaklaştırılır (ekil 2.8.f.). Negatif fotorezistte ise UV ışığa maruz kalmayan kısımlar çözelti halindedir. UV ışık ile negatif fotorezist kürlenir ve banyolama işlemi sonrasında foto maske üzerinde yer alan tasarlanmış yapılar fotorezistte aktarılmış olur.



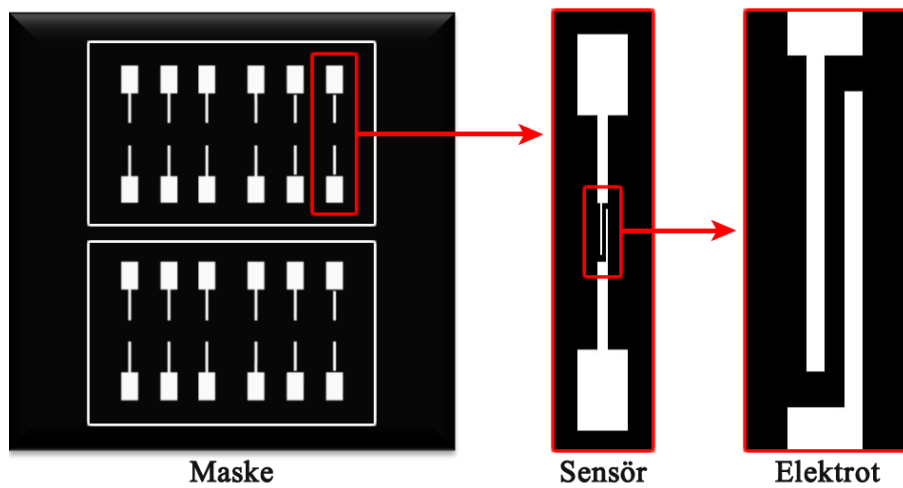
Şekil 2.8. Fotolitografi ile örneğin transferinin gösterimi



Şekil 2.9. Fotolitografi işlemlerinin yapıldığı sarı oda (UNAM)

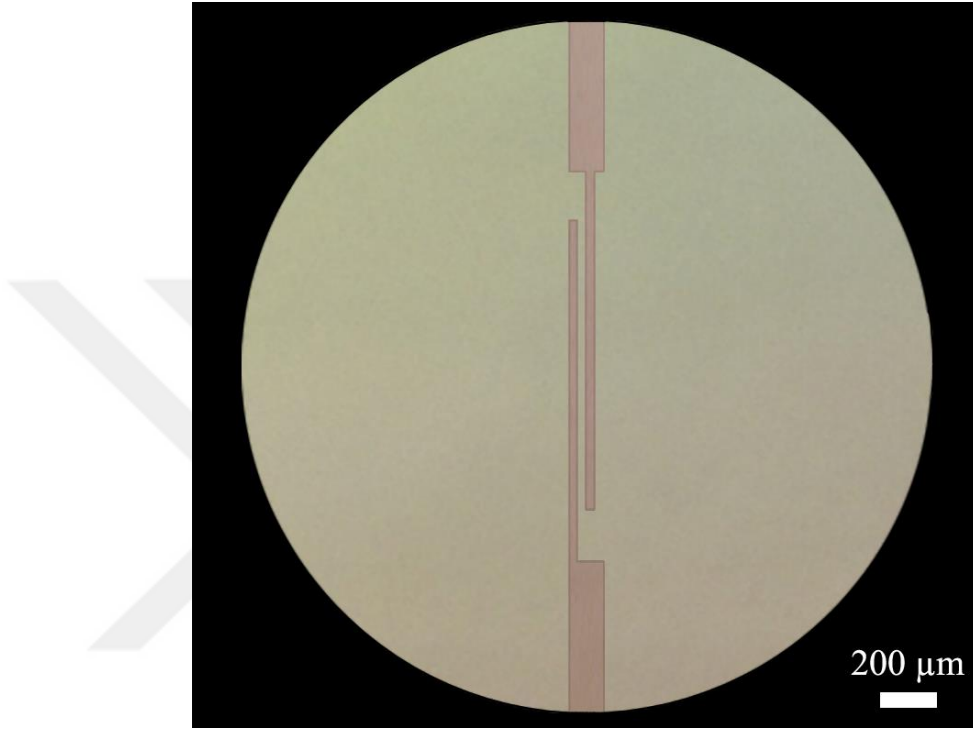
2.5.3. Sensör ve Elektrot Fabrikasyonu

Fabrikasyon süreci UNAM’da (Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi), 100 sınıf temiz oda bölümünde yapıldı. Sensör ve elektrot fabrikasyonu için klasik mikro fabrikasyon teknikleri kullanıldı.



Şekil 2.10. Sensör fabrikasyonu için hazırlanan maskenin görüntüsü

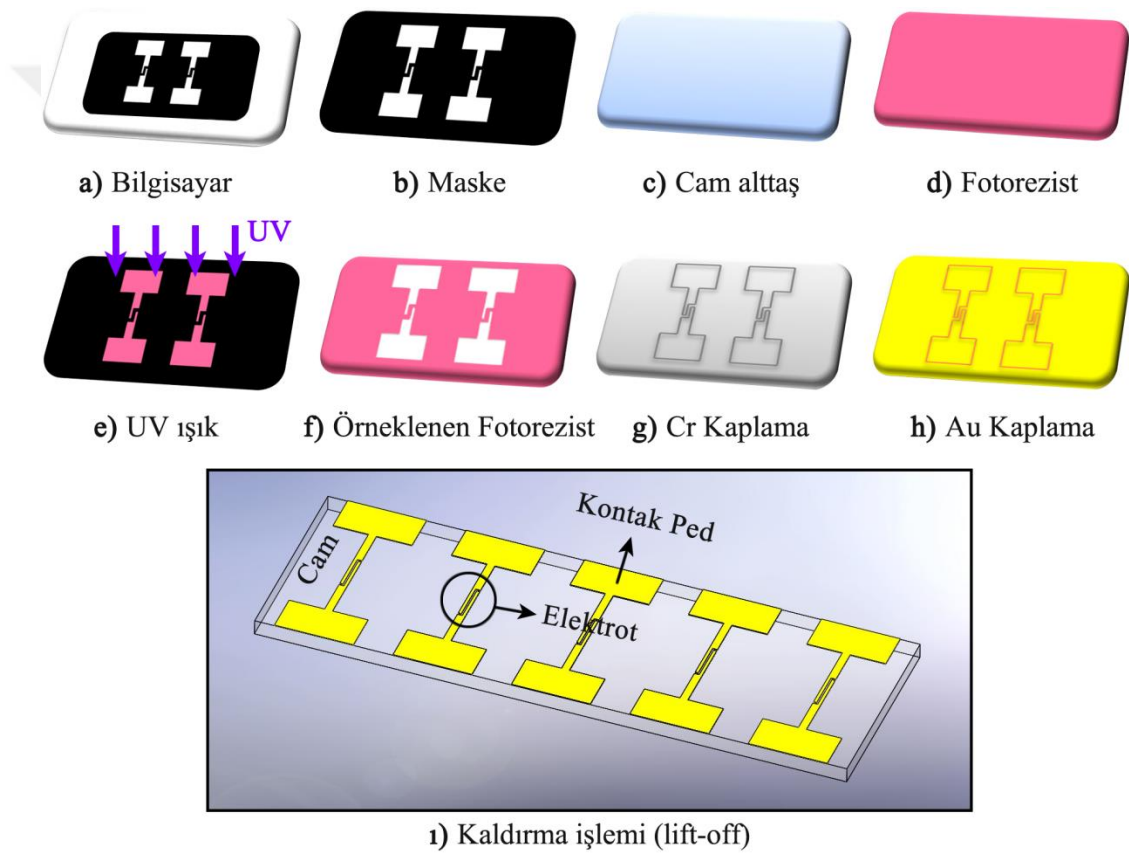
Maske tasarımı, Layout Editor programı kullanılarak çizildi ve UNAM da maske yazıcı cihazı (Heidelberg Instruments DWL-66) ile gerçekleştirildi. Maske yazılırken farklı boyutlardaki elektrotlara sahip sensörlerin üretilmesine olanak sağlayacak tasarım düşünüldü (Şekil 2.10.).



Şekil 2.11. Fotolitografi sonrası elektrotların optik mikroskop görüntüsü

Sensör ve elektrotların fabrikasyonu için alttaş olarak mikroskop lamı (cam) kullanıldı. Fabrikasyon öncesinde yüzey temizliği büyük önem taşımaktadır. Bu yüzden, alttaş yüzeyi aseton ($(\text{CH}_3)_2\text{CO}$), izopropil alkol ($(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$) içerisinde 5'er dakika ultrasonik titreşime tabi tutuldu. Ardından damıtılmış (DI) sudan geçirilerek, azot gazı ile yüzey kurutuldu. Cam alttaş, yüzeyde çözücü kalma ihtimaline karşı 120 °C sıcak plaka üzerinde 20 dk bekletildi. Yüzey temizliğinin ardından, HMDS (Heksametildisilazan) 50 saniye boyunca dakikada 4000 tur dönme hızıyla yüzey üzerine kaplanır. HMDS, fotorezistin cama iyi yapışmasını sağlamaktadır. Fotorezist AZ5214 (MicroChem), 40 saniye boyunca dakikada 5000

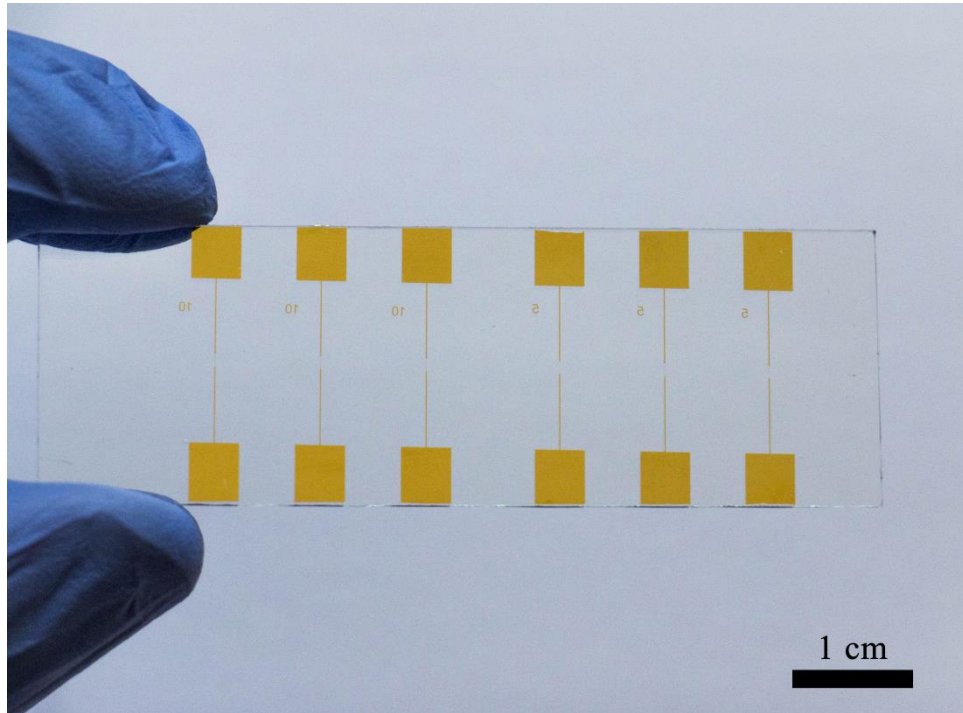
tur dönme hızıyla kaplanır ve cam alttaş 110 °C sıcak plaka üzerinde 50 saniye bekletilir. İstenen tasarımın transferi için UV fotolitografi yöntemi kullanıldı. Fotomaske örneğin üzerine gelecek şekilde ayarlanarak, 40 mJ/cm² UV ışığa EVG620 Mask Aligner cihazı kullanılarak maruz bırakılır. UV pozlama sonrasında cam alttaş AZ400K Developer'a (MicroChem) 50 saniye boyunca maruz bırakılır. Ardından damıtılmış su ve azot gazı ile durulama ve kurutma yapılarak banyolama işlemi gerçekleştirilir. Bu işlem ile istenmeyen bölgelerin çözeltiye karışması sağlanarak, istenen desenin cam alttaş üzerinde kalması sağlanır (Şekil 2.12.).



Şekil 2.12. Sensör ve elektrot fabrikasyonu süreci

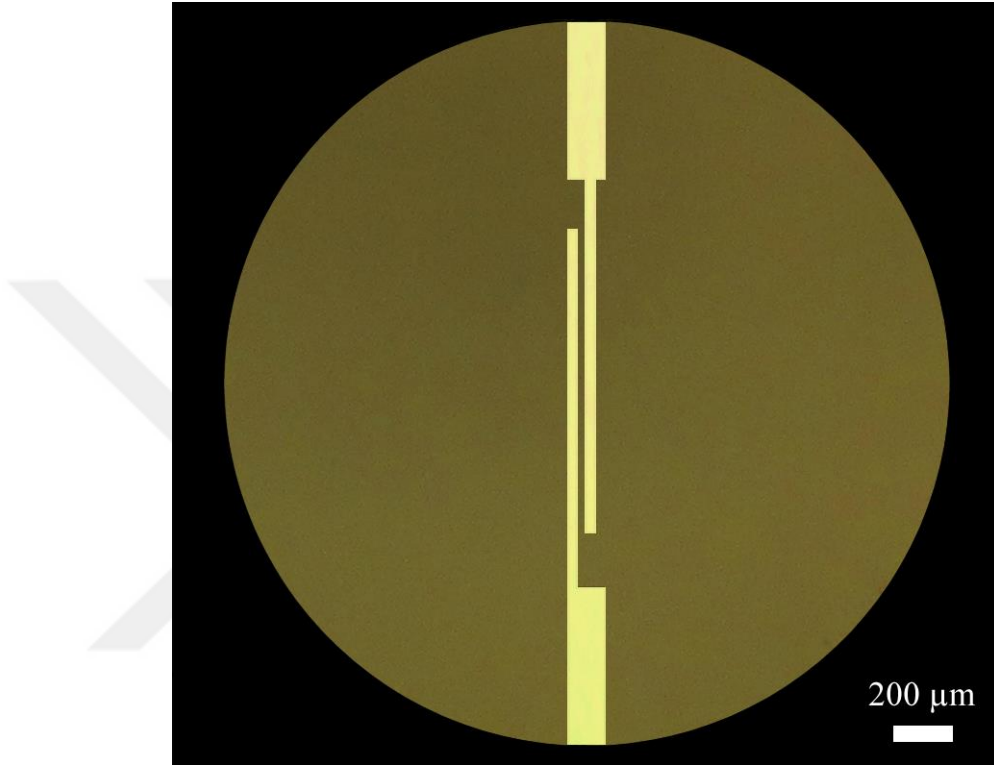
Elektrotların büyütülmesinde ısısal buharlaştırma (VAKSİS, PVD 3S Thermal) cihazı kullanıldı. Metallerin çoğu, oksit oluşumuna negatif serbest enerji göstererek, oksijenle reaksiyona girerken, altın pozitif enerjiye sahiptir ve havaya maruz kaldığı

zaman oksitlenmez. Aynı zamanda yüksek iletkenliğe sahip olduğundan dolayı elektrot malzemesi olarak altın kullanılmıştır. Altının cama daha iyi yapışabilmesi için cam alttaş yüzeyi krom ile kaplanmıştır. Buharlaşan metal molekülleri, hava molekülleri ile çarpıştığında cam alttaş yüzeyine ulaşmadan saçılmaya uğrayabileceği için, buharlaştırma ve kaplama işlemi yüksek vakum altında yapılmaktadır. Isısal buharlaştırma ile kaplama cihazının kazanı kullanılmadan önce istenilen vakum değerine sağlıklı ve hızlı bir şekilde ulaşması için temizlenir. Cam alttaşın yüzeyi, buharlaşan malzemeye doğru çevrilir ve sabitlenir. Ardından potalara kaplanacak olan krom ve altın malzemeleri konarak cihaz vakuma alınır. Potaların çatlamasını önlemek için elektrik akımı kademeli olarak artırılır. Krom ve altın sırası ile %60 ve %30 güç seviyelerinde kaplanır. Malzeme kaplama hızı 0.5 Å/s dir. Krom 20 nm kalınlığında, altın ise 40 nm kalınlığında kaplanmıştır. Kaplama işleminden sonra cam alttaş, istenmeyen kısımları kaldırma işlemi için asetonun içerisinde bir gün bekletilir. Aseton fotorezist tabakasını aşındırarak kaldırır. Asetonun kaldırma işlemini daha iyi yapabilmesi için kısa süreli ultrasonik titreşim yapılabilir. Bu yöntemle kaldırma işlemi (lift-off) denir (Şekil 2.12.).



Şekil 2.13. Üretilen sensörün görüntüsü

Elektrot genişliğinin ve elektrotlar arası mesafenin sensörün hassasiyetine etkisini incelemek için farklı boyutlarda elektrotlar üretildi. Elektrot genişliği (w), elektrotlar arası mesafe (g) $w/g=1$ olacak şekilde 40 μm , 20 μm ve 10 μm genişliğindeki elektrotlara sahip sensörler kullanıldı.

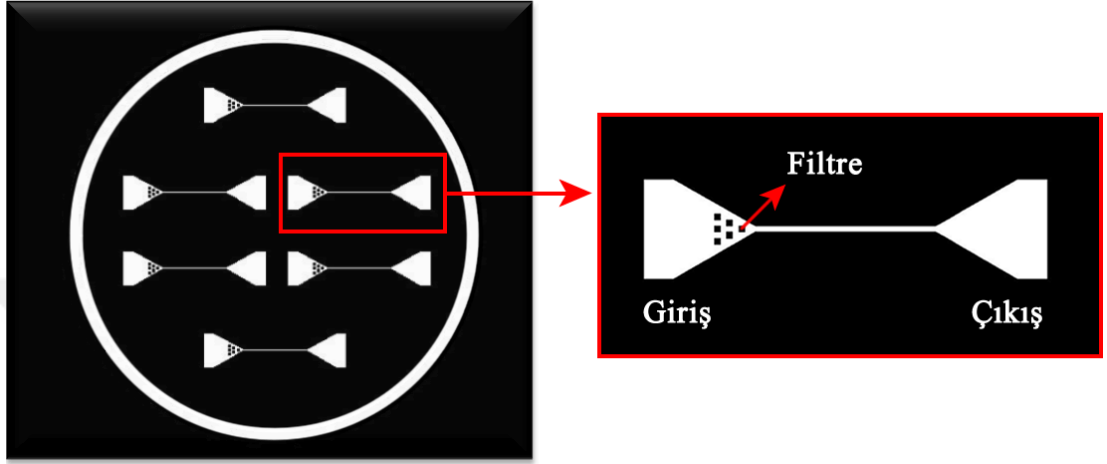


Şekil 2.14. Eş düzlemsel (Coplanar) elektrotların optik mikroskop görüntüsü

2.5.4. Mikro Kanalların Fabrikasyonu

Mikro kanalların üretimi için yine UV fotolitografi yöntemi kullanıldı. UV fotolitografi, mikro ve nano yapıların üretiminde kullanılan standart bir yöntemdir [121]. Kalıp, negatif fotorezist olan SU-8 kullanılarak UV fotolitografi yöntemi ile üretilmiştir. Polimerin sertleşmesinin ardından polimer, kalıbın üzerinden sıyrılır ve kalıbın cihaz özelliklerinden oluşan negatif bir kopyası elde edilir.

Kalıp fabrikasyonundan önce, kanal geometrisi CAD programı ile tasarlanmıştır (Şekil 2.15.). Maske şeffaf röntgen filmine basılmıştır ve film boş bir maske camına yapıştırılmıştır. Maske camı, Mask Aligner cihazına filmin basılı yüzü doğrudan fotoreziste temas edecek şekilde yerleştirilir.

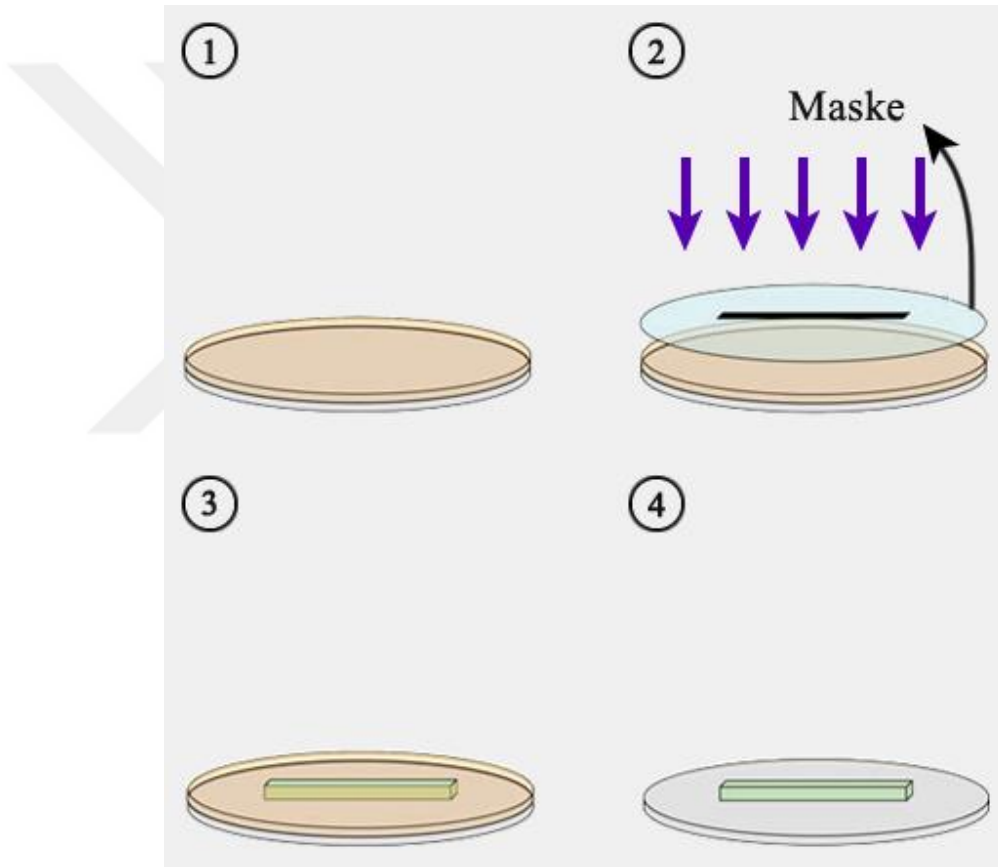


Şekil 2.15. Mikro kanalların fabrikasyonu için hazırlanan maskenin görüntüsü

Kalıp fabrikasyonu süreci Şekil 2.16.'da gösterilmiştir. Kalıp fabrikasyonu için alttaş olarak Silikon atlık kullanıldı. Fabrikasyon öncesinde alttaş yüzeyi sırası ile aseton, izopropil ve DI su ile yıkanarak, azot gazı ile kurutuldu. Si alttaş, yüzeyde çözücü kalma ihtimaline karşı 110 °C sıcak plaka üzerinde 10 dk bekletildi. Yüzeyde kalan bütün çözücüler buharlaştırıldı. Böylece fotorezist Si alttaş yüzeyine daha kolay yapışmaktadır. Si alttaş yüzeyi spin kaplama cihazı kullanılarak negatif fotorezist (SU8) ile kaplanmıştır. 10 µm yüksekliğinde kanallar üretileceğinden SU-8 (Micro Chem) 2005 fotorezisti kullanılmıştır.

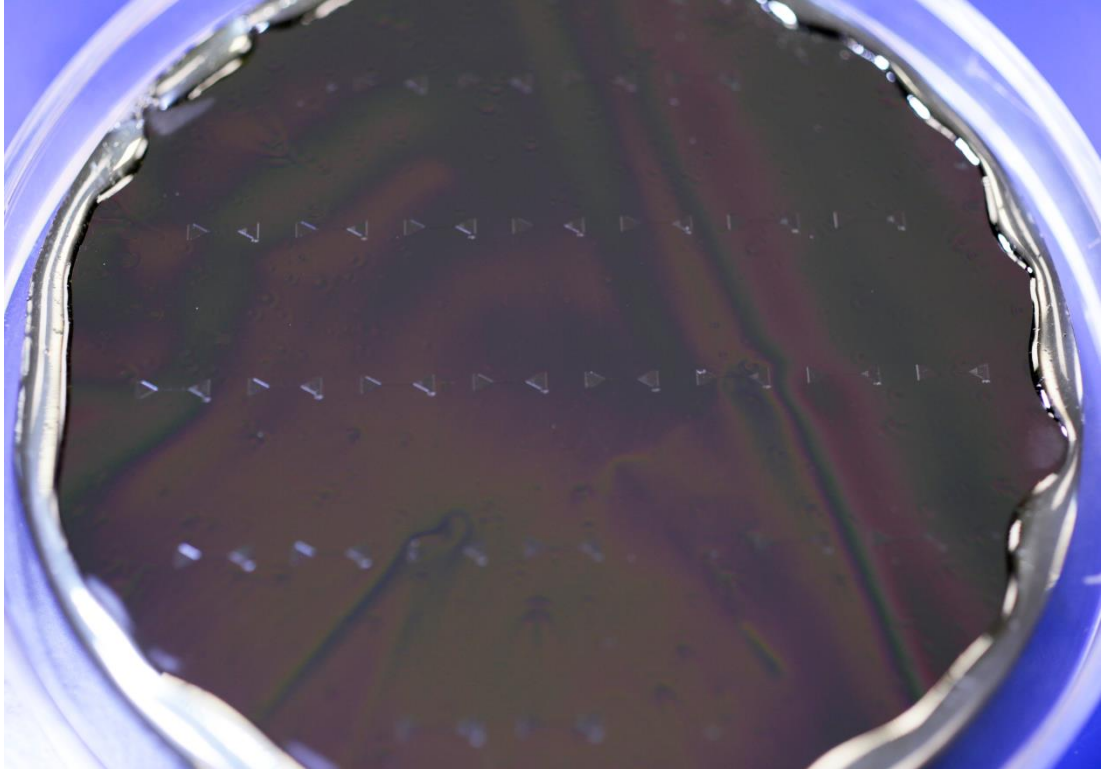
Fotorezistin sayısal isimleri, spin kaplama aşamasında kalınlığa karşılık gelmektedir. Örneğin, dakika başına 2000 devirde, 2005 ve 2050 fotorezistleri sırası ile 5 ve 50 µm kalınlıklarında kaplanmaktadır.

Fotorezistin yüzeye eşit bir şekilde kaplanması için Si alttaşın merkezi spin kaplama cihazının tam ortasına yerleştirilir ve alttaş yüzeyi SU-8 2005 ile kaplanır. Spin kaplama ile kaplanan SU-8, yüzeyde çatlakların olmasını önlemek amacıyla kademeli olarak ısıtılır. Si alttaş 60, 95 ve 60 °C'lik sıcak plakalarda sırasıyla 3, 5 ve 3 dakika boyunca bekletilir. Sonrasında EVG620 Mask Aligner cihazı kullanılarak 40 mJ/cm^2 UV ışığa maruz bırakılır. İlk SU-8 tabakası, PDMS'in (polidimetilsiloksan) silikon yüzeyden rahat ayrılması için bir ara katman olarak kaplandı. Bu yüzden bu pozlamada maske kullanılmadı.



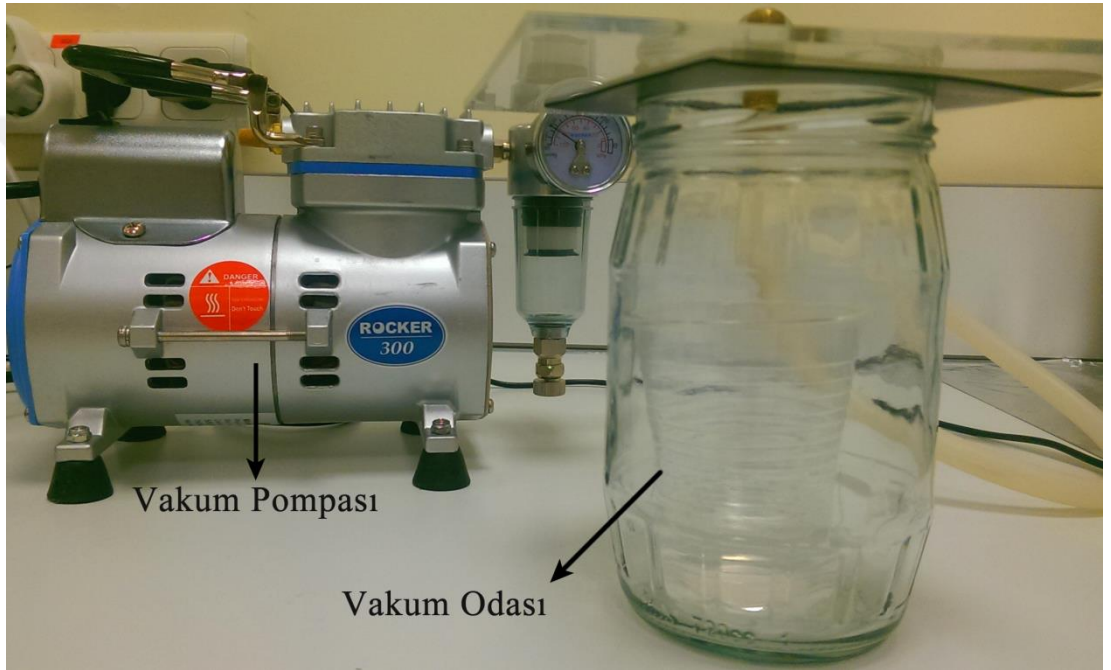
Şekil 2.16. Kalıp üretimi. 1) Fotorezist ile kaplama, 2) UV ışık, 3) Banyolama işlemi, 4) Kalıp

Yapışkan olmayan SU8 2005 ile kaplanan Si alttaşı aynı şekilde tekrar spin kaplama cihazına yerleştirilir ve üzerine fotorezist dökülür. 10 µm yüksekliğinde kanal yapmak için SU8 2005 dakikada 1000 devir ile döndürülür. Spin kaplamanın ardından Si alttaşı 65, 90 ve 65 °C'lik sıcak plakalarda sırasıyla 3, 6 ve 2 dakika bekletilir. Fotomaske örneğin üzerine gelecek şekilde ayarlanarak 40 mJ/cm² UV ışığa EVG620 Mask Aligner cihazı kullanılarak maruz bırakılır. Bu işlem sonrasında SU8 developer ile yıkanır. Si alttaşı azot gazı ile kurutulur ve optik mikroskop altında banyolama işlemi incelenir. Eğer yüzeyde istenmeyen fotorezist kalıntıları varsa, Si alttaşı tekrar solüsyon ile yıkanır ve mikroskop altında kontrol edilir. Banyolama işleminin ardından fotorezistin alttaştan kalkmasını önlemek ve PDMS'in daha rahat sıyrılması için Si alttaştan kenarlarına epoksi yapıştırıcısı sürülür. Yapıştırıcının sertleşmesinin ardından kalıp fabrikasyonu tamamlanır. Üretilen kalıp Şekil 2.17.'de gösterilmiştir.



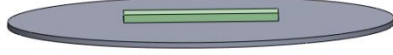
Şekil 2.17. Üretilen kalıbın görüntüsü

PDMS, reaksiyona girmeyişi, şeffaflığı ve biyouyumluluğu gibi özellikleri sayesinde biyolojik ve kimyasal uygulamalarda kullanılan en önemli materyallerden birisidir [122]. Ayrıca PDMS kullanması oldukça kolay ve cama kolayca bağlanabilen bir maddedir. Bu yüzden mikro kanal üretimi için PDMS kullanıldı. PDMS, 10/1 (w/w) oranında sırası ile Polidimetilsiloksan ve silikon elastomer kimyasalları bir plastik bardak içerisinde hava baloncukları oluşuncaya kadar iyice karıştırılır. Sonrasında Şekil 2.18.'de görüldüğü gibi vakum sisteminde bekletilerek gazı giderilir.



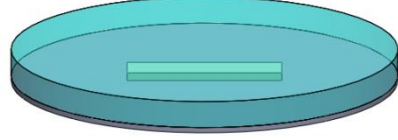
Şekil 2.18. Vakum sistemi

①



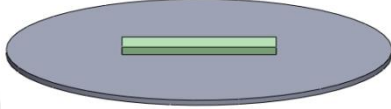
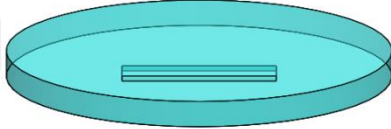
Kalıp

②



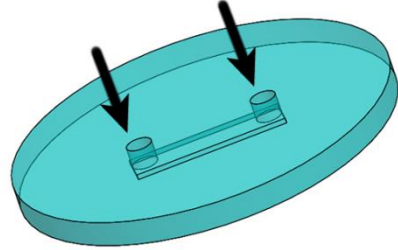
PDMS dökme

③



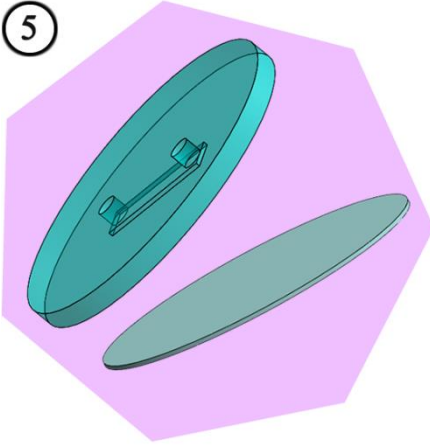
PDMS ayırma

④



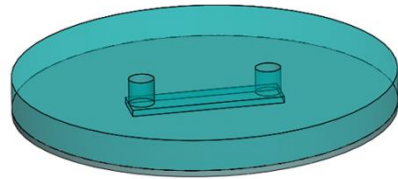
Giriş deliği açma

⑤



Plazma işlemi

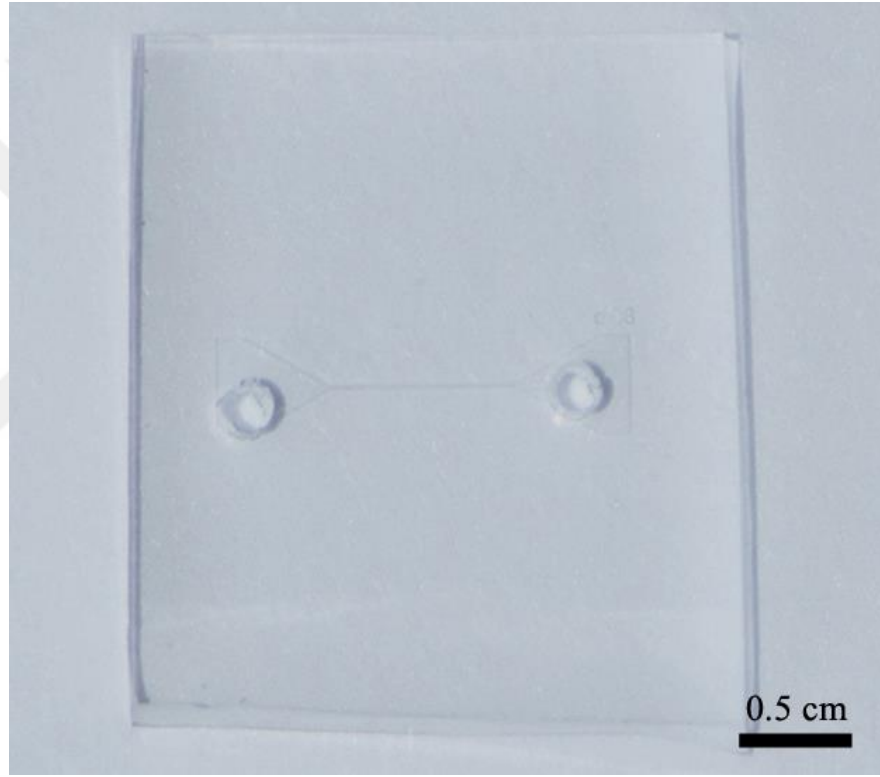
⑥



Birleştirme

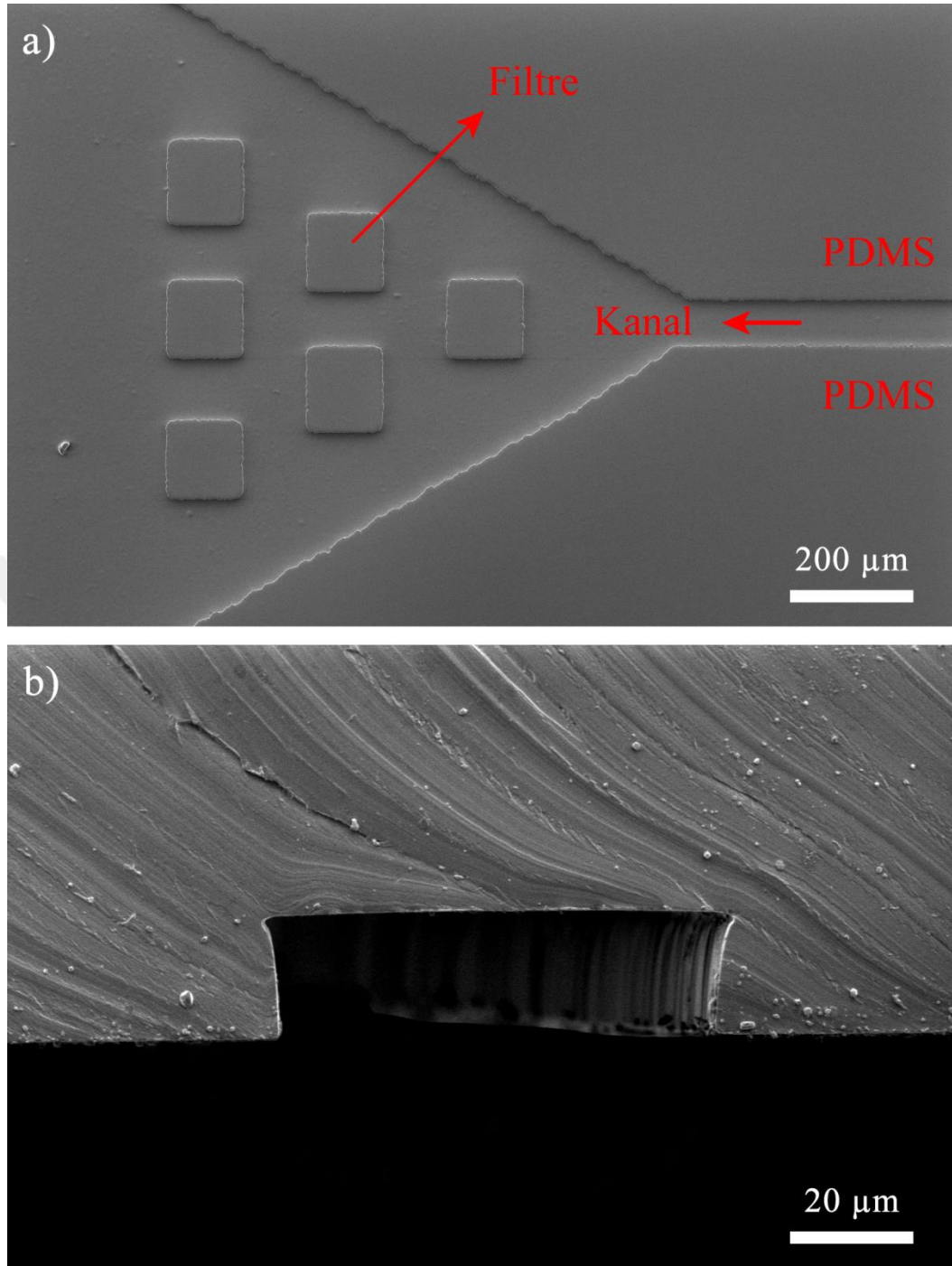
Şekil 2.19. Mikro kanal üretim süreci

Hava baloncuklarından arındırılan PDMS alüminyum pan içerisinde kalıbın üzerine dökülerek 100 °C'deki sıcak plaka üzerinde 4 saat bekletilerek kalıptan sökülür. Kurlenen ve sertleşen PDMS, kauçuk gibi esnek yapıya sahiptir. PDMS, kalıp üzerindeki çıkıntılar PDMS üzerinde girinti, kalıp üzerindeki girintiler ise PDMS üzerinde çıkıntı olacak biçimde kalıbın şeklini alır (Şekil 2.19.). Kalıptan ayrılan PDMS bloğu maket bıçakları ile kanalların boyutlarına uygun şekilde kesilir ve biyopsi punch ile giriş-çıkış delikleri açılır. Şekil 2.19. PDMS ile mikro kanal elde etme sürecini göstermektedir.



Şekil 2.20. PDMS mikro kanal görüntüsü

Üretilen PDMS mikro kanalların profil görüntüsü ve kanal kesitinin Taramalı Elektron Mikroskopunda (SEM) alınan fotoğrafları Şekil 2.21.'de gösterilmiştir.

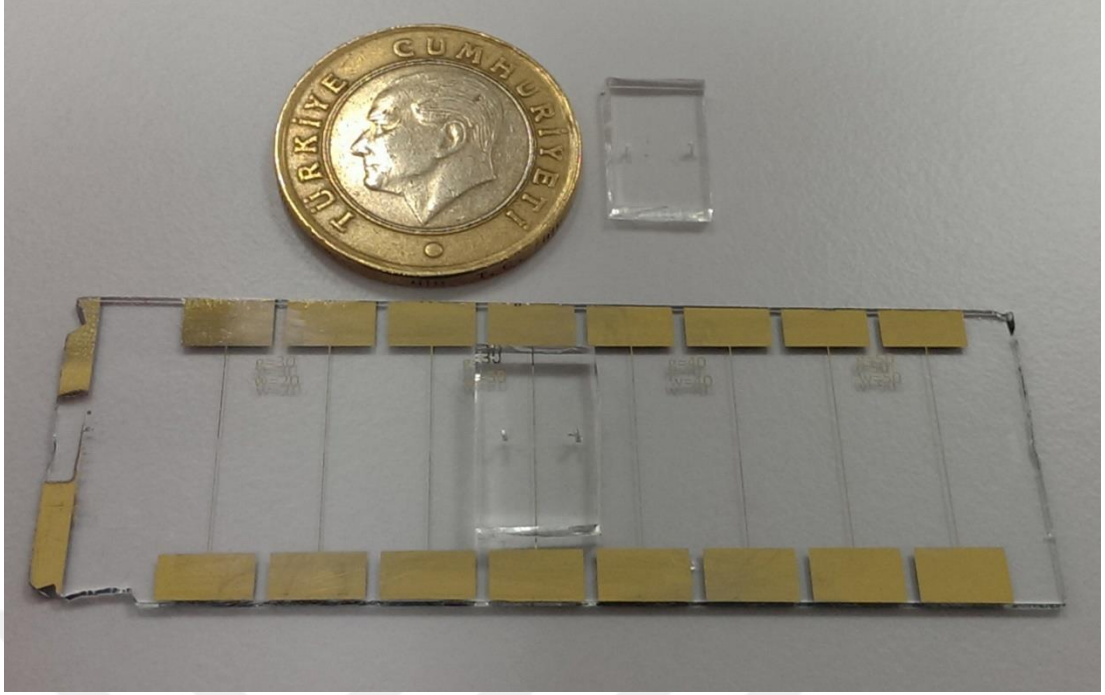


Şekil 2.21. Mikro kanalın SEM de alınmış a) profil görüntüsü, b) kesit görüntüsü



Şekil 2.22. Plazma asher cihazı

PDMS mikro kanalı, cam alttaşa plazma aktivasyonu ile bağlanır. Plazma PDMS yüzeyindeki C-H bağını kırar ve PDMS yüzeyi cam alttaşın yüzeyi ile temas ettiğinde yeni bağlar oluşturur. Bu iki materyal geri dönüşü olmayan biçimde bağlanır. Plazma, Şekil 2.22.'de görüldüğü gibi, bir mikrodalga fırın, bir vakum odası ve bir vakum pompasından oluşturduğumuz ekipman ile üretilir. Plazma sadece PDMS yüzeyini aktive etse de, hem cam yüzeyine hem de PDMS mikro kanalına uygulanır. Burada plazma, cam yüzeyini temizleyerek daha iyi yapışmasını sağlamaktadır. Bağlanma işlemi gerçekleşmeden önce cam yüzeyi aseton, izopropil alkol ve DI su ile yıkanarak temizlenmiştir. Plazma işlemi gerçekleştirildikten sonra cam alttaşın yüzeyi ile PDMS yüzeyinin arasında hava kalmayacak şekilde birbirlerine yapıştırılır. PDMS mikro kanalı mikro elektrotların üzerine yatay gelecek şekilde konulur. PDMS in cam alttaş yüzeyine daha iyi yapışması için mikroakışkan çip 100 °C deki sıcak plaka üzerinde yaklaşık 2 saat bekletilir. Üretimi gerçekleştirilen mikroakışkan çipin görüntüsü Şekil 2.23.'de gösterilmiştir.



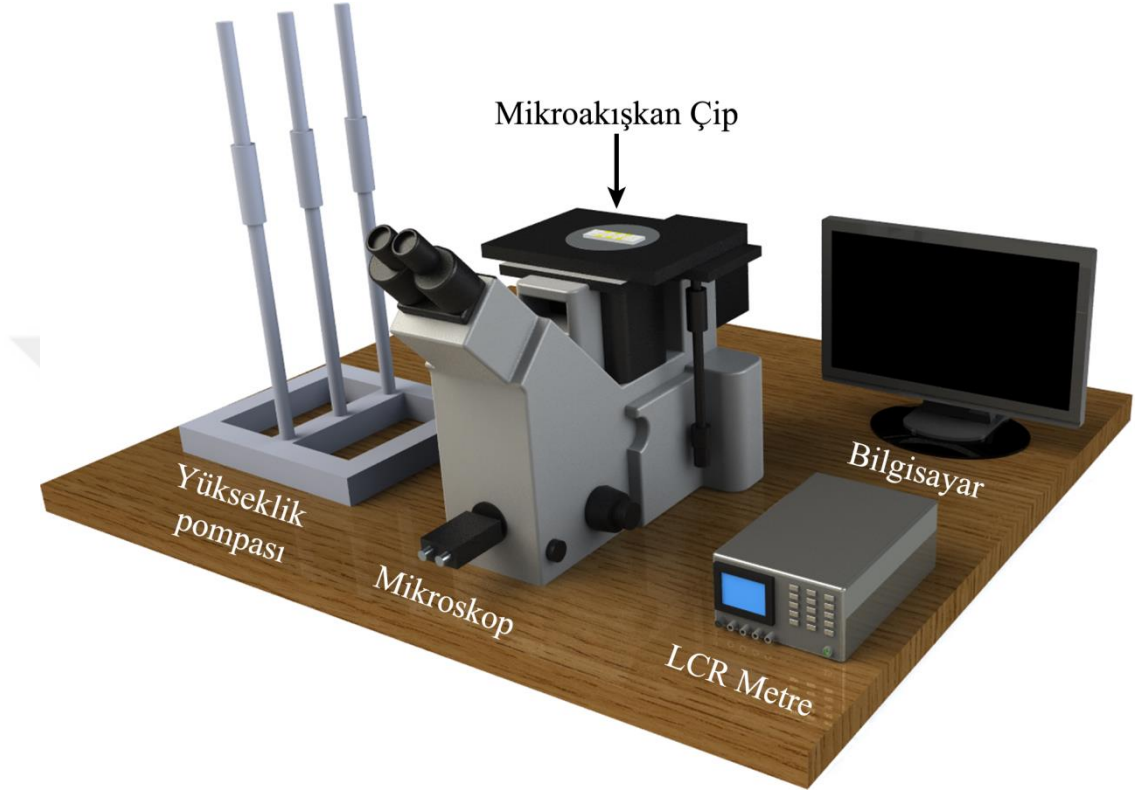
Şekil 2.23. Üretilen mikroakışkan çip görüntüsü

2.5.5. Ölçüm Sistemi

Kapasitans ve empedans ölçümleri için LCR metre (Agilent E4980A) cihazı kullanıldı. LCR metre, bir devrenin üç temel parametresini ölçebilmektedir. LCR metre, devreye sabit bir AC voltaj uygular ve voltajın akıma oranı olan empedansı kullanarak AC akımını ölçer. LCR metre ile BNC konnektörüne tek taraftan bağlanan RG56 eş eksenli kablolardan yapılmış problemler kullanılarak ölçüm alınmıştır. Şekil 2.24.'de ölçüm sistemimiz görülmektedir.

LCR metrenin kullanımı ve veri toplama etkinliği için Labview kodu yazıldı. Labview kodu manuel empedans aralığında ve kısa ölçüm zamanlama modunda kullanıldı. Bir masaüstü bilgisayar kullanılarak 184 Hz'lik örnekleme hızına ulaşıldı. Bu örnekleme hızı, veri toplama kartları sayesinde örnekleme hızının kHz düzeylerinde olan lock-in amplifier sistemlerine [23] kıyasla düşük olmasına rağmen, farklı boyutlara sahip parçacıkların tespitinde sağlıklı sonuçlar vermiştir. Lock-in amplifier sistemlerine göre LCR metre ile ölçüm yapmak için herhangi bir elektronik

devreye gerek yoktur. LCR metrenin tak çalıştır bir sistem olması en büyük avantajıdır. Örnekleme hızı düşük olduğundan dolayı akış hızının düşük seviyede olması gerekir.



Şekil 2.24. Ölçüm sistemi düzeneği

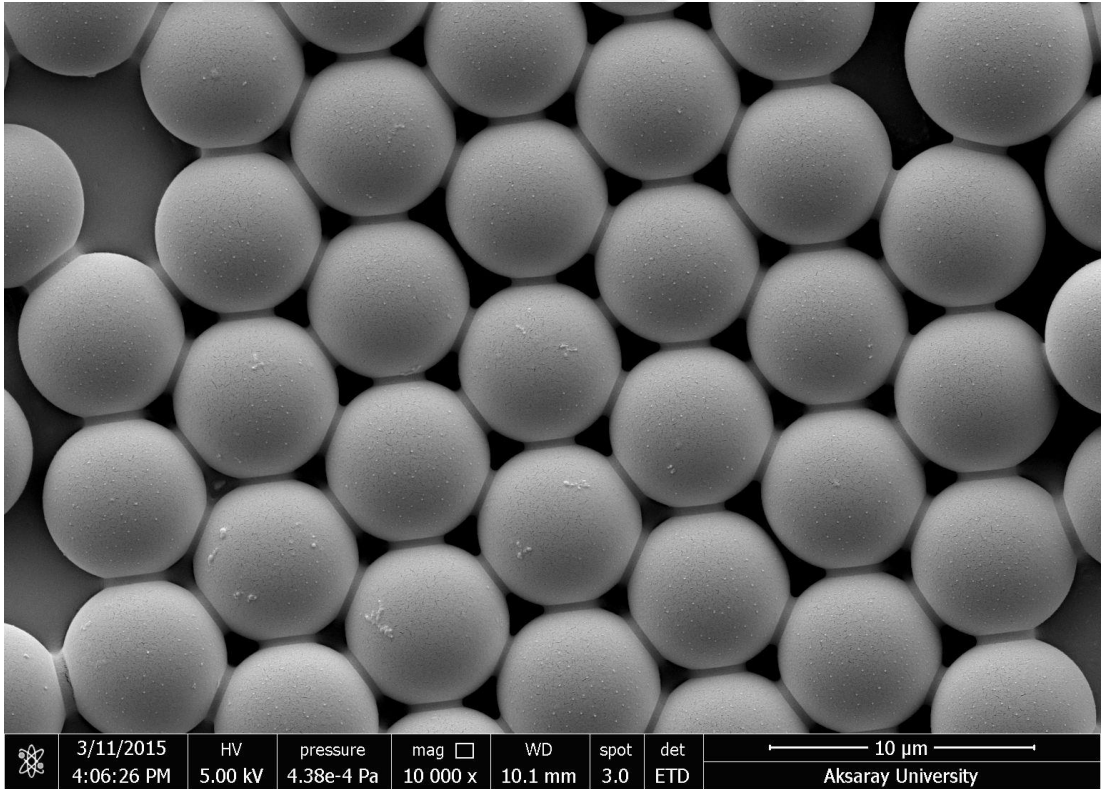
Akış hızını kontrol edebilmek için Şekil 2.24.'de görülen yükseklik pompası tasarlandı. Herhangi bir noktadaki sıvı basıncı Pascal prensibine göre Eşitlik 2.15 ile hesaplanmaktadır.

$$P = \rho gh \quad (2.15)$$

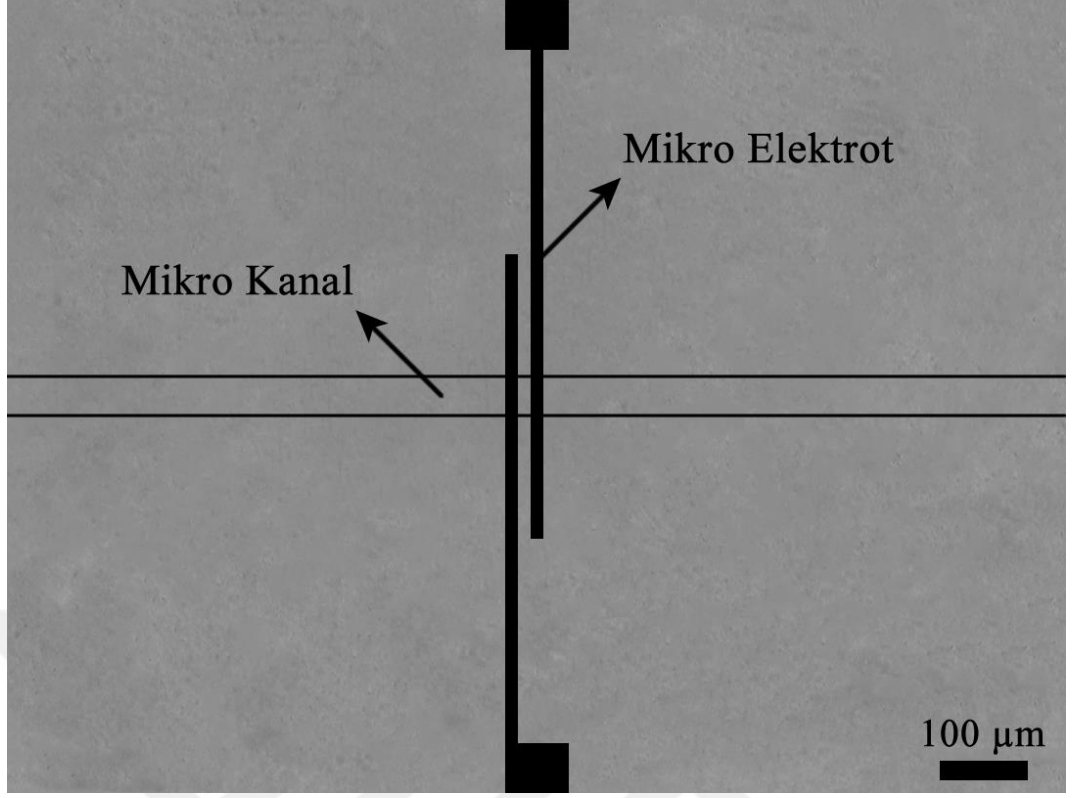
Bu durumda 1 cm'lik su yüksekliği, 1 mbar'lık basınç artışına karşılık gelmektedir. Mikro kanal içerisindeki basınç, vial şişelerinde bulunan sıvıların seviyesini

yükseltme veya alçaltma yoluyla kolayca kontrol edilebilir. Böylece, yükseklik pompası ile daha kesin ve çok daha kolay basınç kontrolü yapılır.

Hücreler elde edilmesi ve manipüle edilmesi zor parçacıklar olduğundan ilk önce hücre kullanmak yerine hücreye eşdeğer yalıtkan parçacıkların kullanılması daha sağlıklı olacaktır. Bu bilgi ışığında hücre tespiti deneylerinden önce 6 μm çapındaki polistiren mikro küreler (bead) kullanıldı. 6 μm çapına sahip mikro kürelerin SEM de çekilmiş görüntüsü Şekil 2.25.'de gösterilmiştir. Mikro küreler 0.2 M'lık NaCl çözelti içerisinde yani 2.5 S/m'lik iletkenliğe sahip sıvı içerisinde kanal içerisine gönderilmiş ve tespit edilmiştir. İletkenlik seviyesi arttıkça sinyal gürültü oranı (SNR) düşmektedir. Mikroorganizmalar yaklaşık 0.2 M tuzlu suda (2.5 S/m) yaşamaktadırlar. Bu yüzden mikro küre deneyleri mikroorganizmaların yaşayabileceği iletkenlik seviyesine eş değer sıvı içerisinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.25. 6 μm çapındaki mikro kürelerin SEM görüntüsü



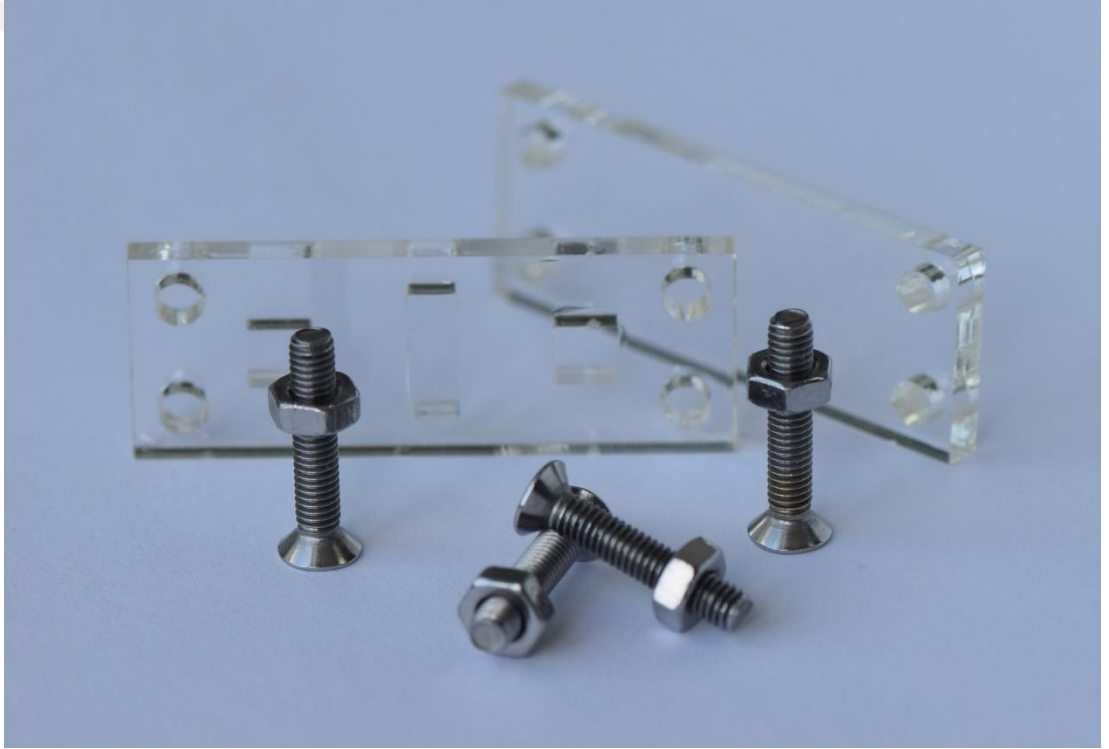
Şekil 2.26. Mikro elektrot üzerine mikro kanal entegre edilerek oluşturulan mikro çipin optik mikroskop görüntüsü

Mikroakışkan çip, bir önceki konuda açıklandığı gibi PDMS mikro kanalın mikro elektrotlara sahip cam alttaşa bağlanması ile üretilmektedir. Şekil 2.26.'da gösterildiği gibi kanal elektrotlara yatay bir şekilde bağlanmıştır. Mikro kürelerin bulunduğu çözelti yükseklik pompasının üzerine konularak mikroakışkan çipe bağlanmıştır. Mikroskop tablası, BNC konektörleri ve çözelti LCR metre üzerinde bulunan topraklama çıkışı kullanılarak topraklanmıştır.

2.5.6. Tekrar Kullanılabilir Bağlanma Yöntemi

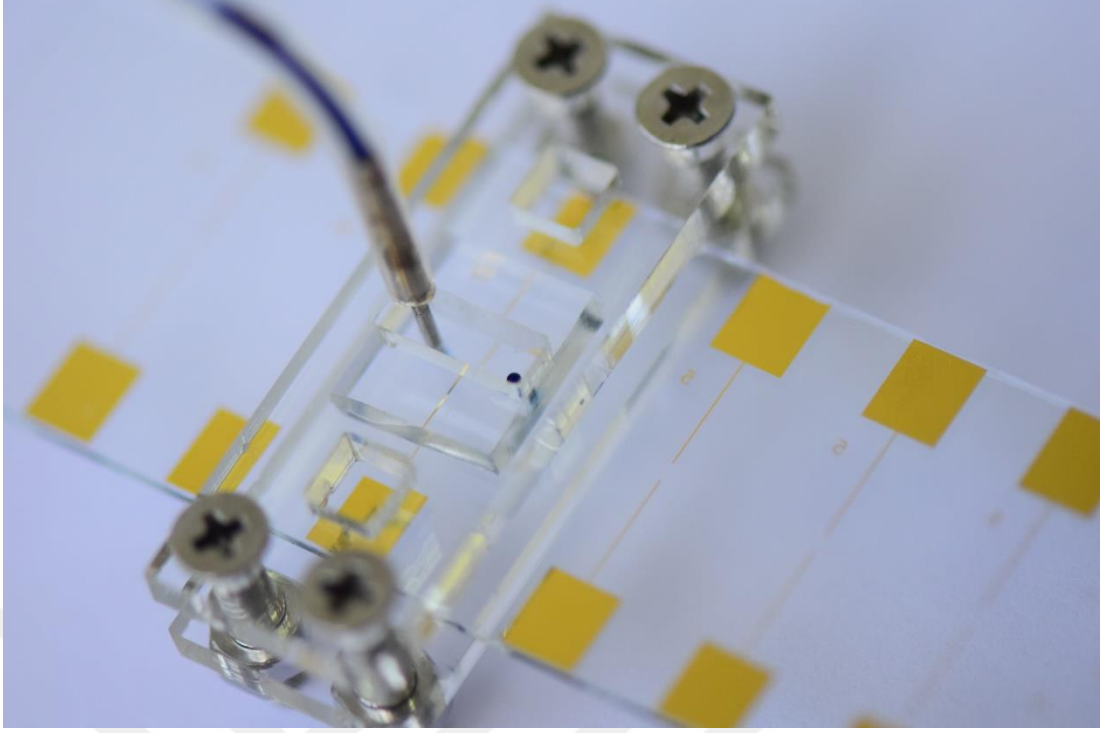
Bir mikroakışkan çip üzerinde 6 tane sensör bulunmaktadır. Bunların her birine birer kanal entegre edilebilmektedir. Plazma uygulanarak entegre edilen kanallar sıvı içerisindeki farklı parçacıklar veya PDMS kalıntılarından dolayı tıkanabilmektedir.

Bu durumda tıkanan bir kanal aynı zamanda kullanılamayacak bir sensör anlamına gelmekte ve yeni sensör fabrikasyonu doğmaktadır. Deneyler bu şekilde hem daha masraflı hem de ekstra iş yükü gerektirdiğinden bu problemi aşabilmek için kanalı sensör üzerine plazma ile entegre etmek yerine sıkıştırıp herhangi bir tıkanma durumunda kanalı kaldırıp temizleyip tekrar kullanılabilecek bir düzenek geliştirildi [123]. Plastik cam olarak adlandırılan ve kolay işlenebilen, kesilebilen, delinebilen Pleksi kullanılarak kanallar sensör üzerine vidalar yardımıyla sıkıştırılarak sabitlendi. Şekil 2.27.'de görüldüğü gibi kanalları sıkıştırmak için kullanılacak olan Pleksi tasarlandıktan sonra CO₂ lazer kullanılarak kesildi.



Şekil 2.27. Kanalları sıkıştırmak için tasarlanan Pleksi

Mikro kanallar tıkanrsa bile sensör üzerinden alınıp yıkanabilir ve tekrar sensör üzerine bağlanabilir. Bu yöntem zaman tasarrufu sağlamakta ve araştırma maliyetini düşürerek tıkanan mikroçipi tekrar kullanabilme olanağı sağlamaktadır.



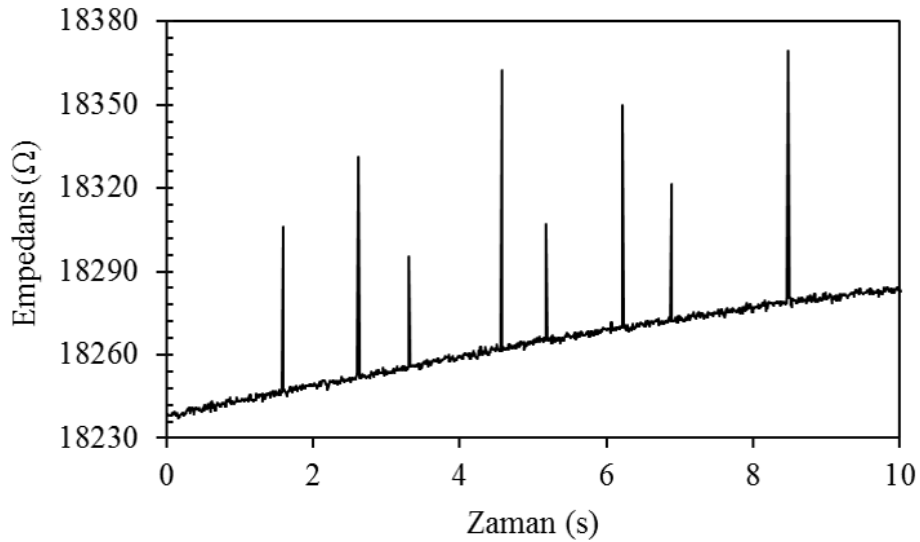
Şekil 2.28. Pleksi kullanılarak elde edilen mikroakışkan çip görüntüsü

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

3.1. Mikro Parçacık Tespiti

Hücreler elde edilmesi ve manipüle edilmesi zor parçacıklar olduğundan ilk önce hücre kullanmak yerine hücreye eşdeğer yalıtkan parçacıkların kullanılması daha sağlıklı olacaktır. Bu bilgi ışığında hücre tespiti deneylerinden önce 6 μm çapındaki polistiren mikro küreler kullanıldı.

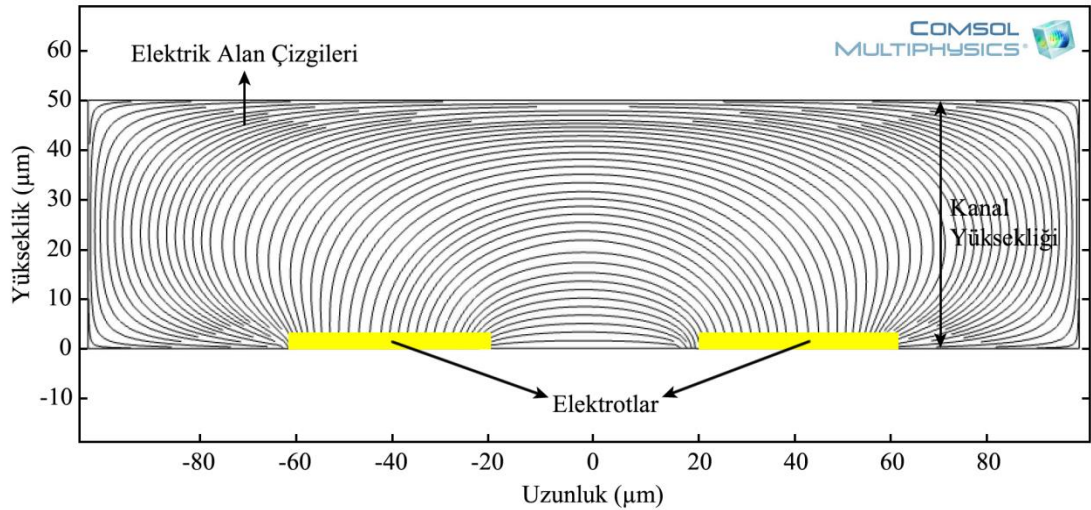
Deneysel ölçüm sistemi sinyal sapması, SNR ve örnekleme hızı gibi performans değerlendirmesi için kullanılır. Mikro küreler, içerisinde 2.5 S/m iletkenliğine sahip NaCl çözeltisi bulunan vial içerisine konulur ve vial yükseklik pompasına yerleştirilir. Vial mikroakışkan çip seviyesinden biraz daha yükseğe kaldırıldığında kanal içerisinde sıvı akışı sağlanır. Akış oranı vialin yüksekliğine göre ayarlanır.



Şekil 3.1. Mikro küre geçişi sırasında oluşan empedans verisi

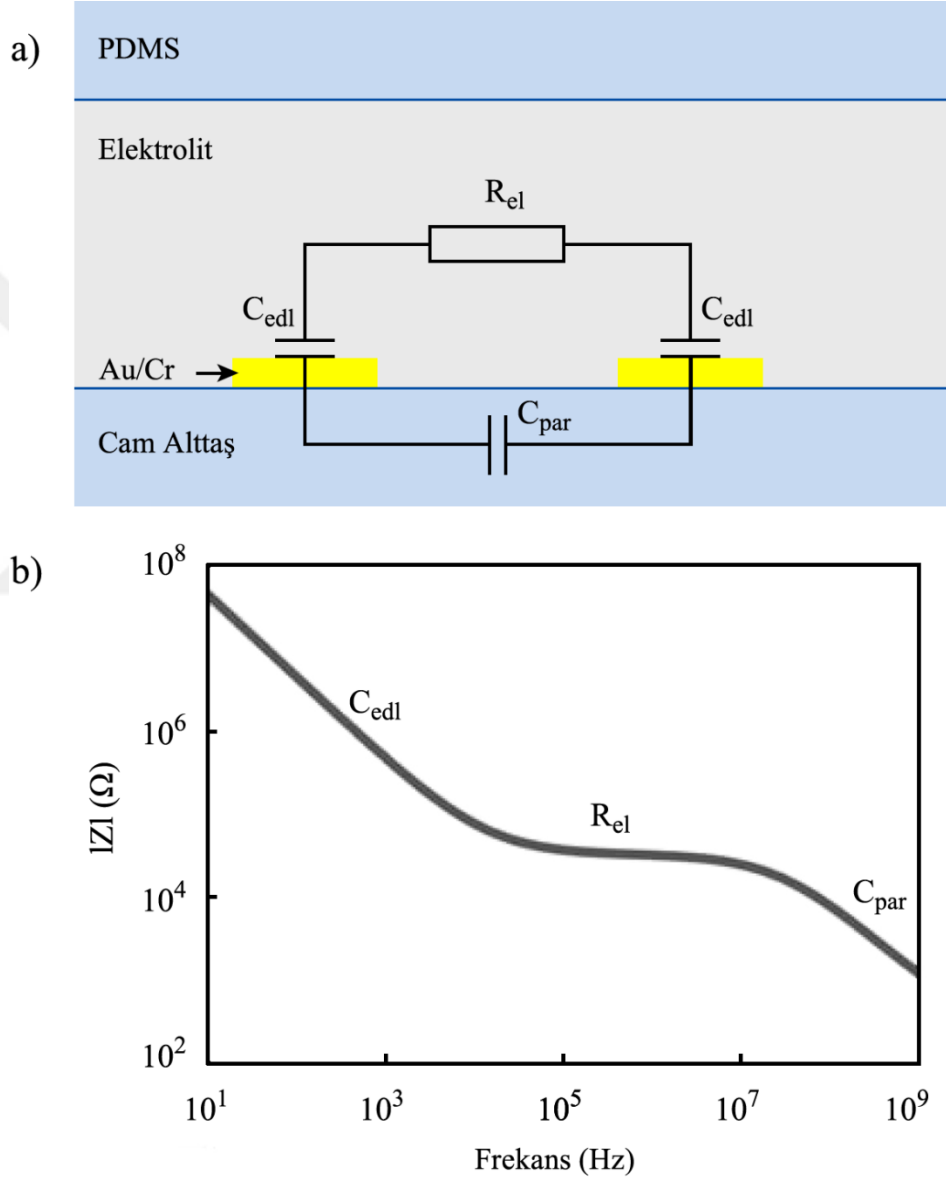
Basınç pompası ya da şırınga pompası yerine, düşük basınç değerlerinde akış oranı üzerine daha yüksek hassasiyete sahip yükseklik pompası kullanılır. Kanal ile çözelti arasındaki iletişim metal şırınga bağlantı parçaları ile yapılır. Tüm düzenek LCR metre üzerinde bulunan topraklama çıkışı kullanılarak topraklanır. Çözeltinin topraklama işlemi ise metal bağlantı parçaları ile yapılır. Topraklama işleminden sonra ölçüm sistemi düzeneğinde içerisinde mikro küreler bulunan çözelti kanala gönderilir ve empedans verisi LabVIEW kodu ile kaydedilir.

Empedans verisi kaydedilirken elektrotlardan geçen mikro küreler mikroskop kamerasından incelenir. Böylelikle elektrotlardan geçen bir mikro kürenin etkisi empedans grafiğinden gözlemlenir. Şekil 3.1.'de zamana bağlı empedans verisi gösterilmektedir. Buradaki her bir pik elektrotların üzerinden geçen bir mikro küreyi temsil eder. Mikro kürelerin her biri aynı boyuta sahip olmasına rağmen farklı büyüklüklerde empedans sinyali vermektedir. Elektrotlara yakın geçen mikro küreler daha büyük sinyal verir. Bu olay eş düzlemsel elektrotların etrafında oluşan elektrik alan çizgileri dağılımından ortaya çıkar. Şekil 3.2.'de Comsol Multiphysics'de yapılan simülasyon ile kanal içerisinde oluşan elektrik alan çizgilerinin dağılımı gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Comsol Multiphysics'de yapılan simülasyon ile kanal içerisindeki elektrik alan çizgilerinin dağılımı

Elektriksel ölçüm için en büyük zorluk, genellikle kapasitif olan ve elektrotlarla sıvı arasındaki yüzeyde oluşan elektriksel çift katmandır. Elektrotlar, uygulanan uyarı voltajından dolayı polarize olurlar ve çözeltideki zıt şarj olmuş iyonları etkilerler. Bu şarj olan iyonlar elektrotların yüzeyine gelir ama elektrotların üzerinden geçemezler. Bu yüzden elektrotların yakınında bir araya gelerek toplanırlar.



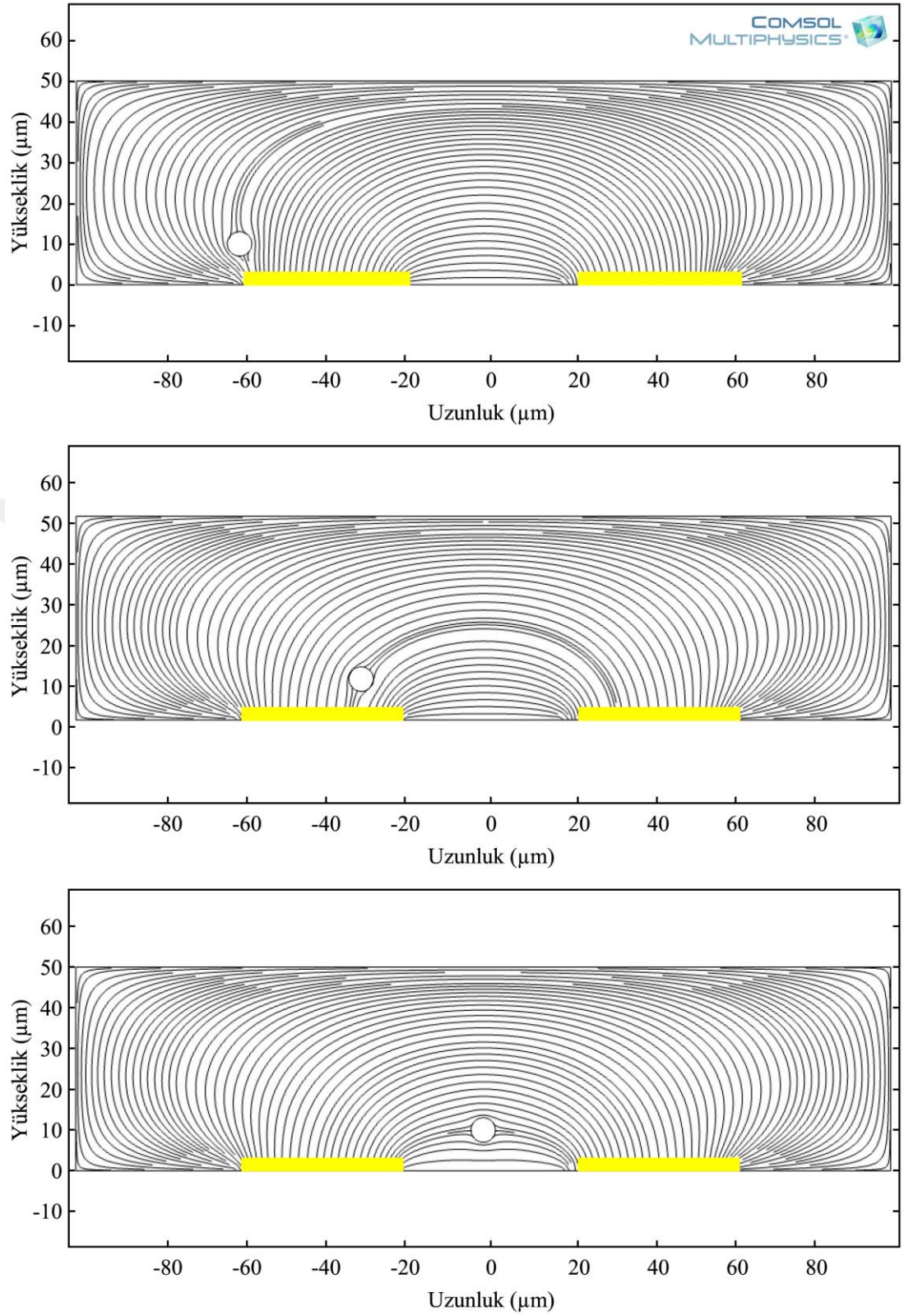
Şekil 3.3. Mikroakışkan sistemin a) Eşdeğer devre modeli b) Frekansa bağlı empedans grafiği

EDL, kapasitif davranışından dolayı özellikle düşük frekanslarda baskın özellik gösterir. Frekans arttıkça, EDL'nin empedansı azalır ve çözeltiye daha fazla voltaj ulaşır. Diğer durumda voltaj, analizin yapıldığı yerdeki çözeltiye ulaşmadan EDL'ye ulaşır.

Şekil 3.3.a. mikroakışkan sistemin eşdeğer devre modelini göstermektedir. Eşdeğer devre modeli iki çift katmanlı kapasitans (C_{dl}), elektrolit direnci ve parazit kapasitansından oluşur. Şekil 3.3.b. eşdeğer devre modelinin frekansa bağlı empedans grafiğini göstermektedir. Elektrotlardaki arayüzü olayları düşük frekanslarda spektrum sinyalini etkileyen çift katmanlı kapasitans ile basitleştirilebilir. Yüksek frekanslarda empedans değerinin düşmesi, iki elektrot arasındaki direk birleşimin sebep olduğu sistemin parazit kapasitansından kaynaklanmaktadır.

Sisteme 2 MHz sinusoidal sinyal uygulanır. Sürekli değişken voltajdan dolayı akım sürekli devam eder. Bu, çözeltinin içinde hareket edebilen iyonları karıştırır. Saf su yalıtkan bir çözelti olmasına rağmen Na^+ ve Cl^- iyonlarının eklenmesi iletkenliğini sağlar. İletken çözeltinin yerine yalıtkan bir mikro küre geçtiğinde, çözeltideki azalan yük taşıyıcılarından ötürü sistem önceki kadar elektrik akımını iletmez. Başka bir ifade ile Şekil 3.4.'de Comsol Multiphysics'de yapılan simülasyonda görüldüğü gibi mikro küre elektrik akımını engeller.

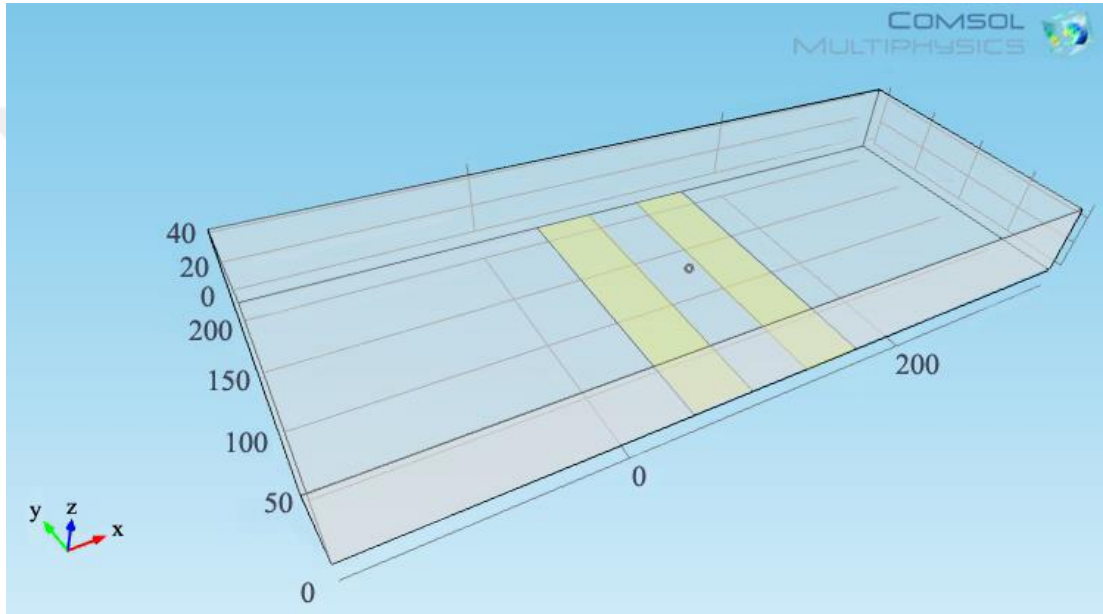
Mikroakışkan sistemin elektriksel modeli dikkate alınırsa kanal içerisinde 2.5 S/m iletkenliğine sahip NaCl çözeltisi elektrotlar üzerinden geçtiğinde yüksek frekans değerinde kapasitörler kısa devre olur ve sadece empedans (direnç) değeri okunur. Polistiren mikro küre elektrotlar üzerinden geçerken elektrik akımını engeller ve bu durumda sisteme sanki bir seri direnç bağlanıyormuş gibi empedans değerinde artma meydana gelir. Şekil 3.1.'de gösterildiği gibi empedans değişimi bir pik olarak kaydedilir ve her bir pik elektrotlar üzerinden geçen bir mikro küreyi temsil eder.



Şekil 3.4. Mikro kürenin elektrotlar üzerinden geçen elektrik alan çizgilerini engellemesinin Comsol Multiphysics’de yapılan simülasyon ile gösterimi

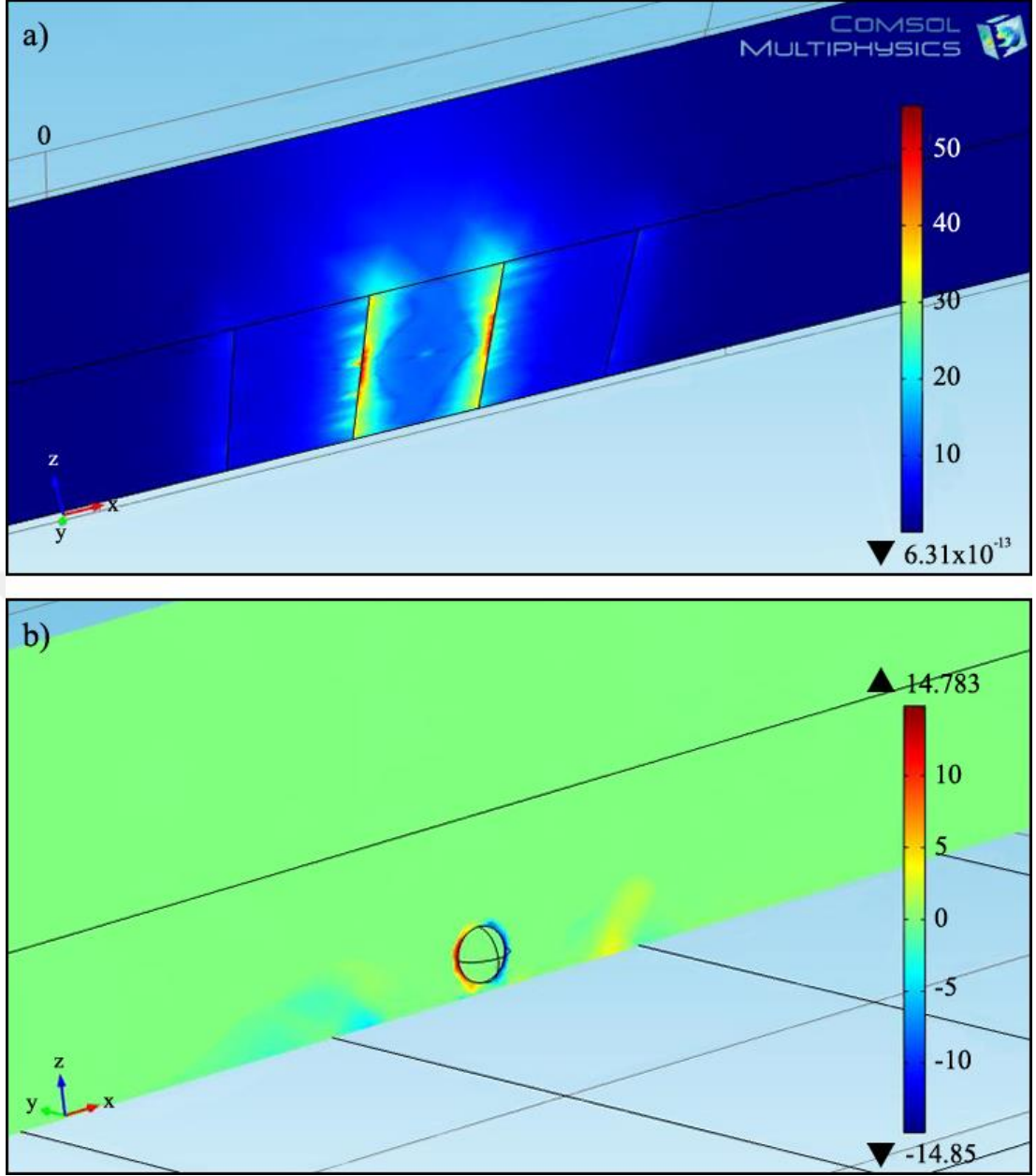
3.2. Mikroakışkan Çip Simülasyonu

Comsol Multiphysics’de, yüksek hassasiyette bir mikroakışkan sistem kurabilmek ve deneysel sonuçlar ile kıyaslayabilmek için simülasyonlar yapıldı. Mikroakışkan çip, 40 μm genişliğine ve 40 μm aralığa sahip elektrotların üzerine, 200 μm genişliğine ve 50 μm yüksekliğine sahip bir mikro kanal entegre edilerek modellenmiştir. Şekil 3.5.’de Comsol Multiphysics’de modellenen mikroakışkan çip gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Mikroakışkan çipin geometrik modeli

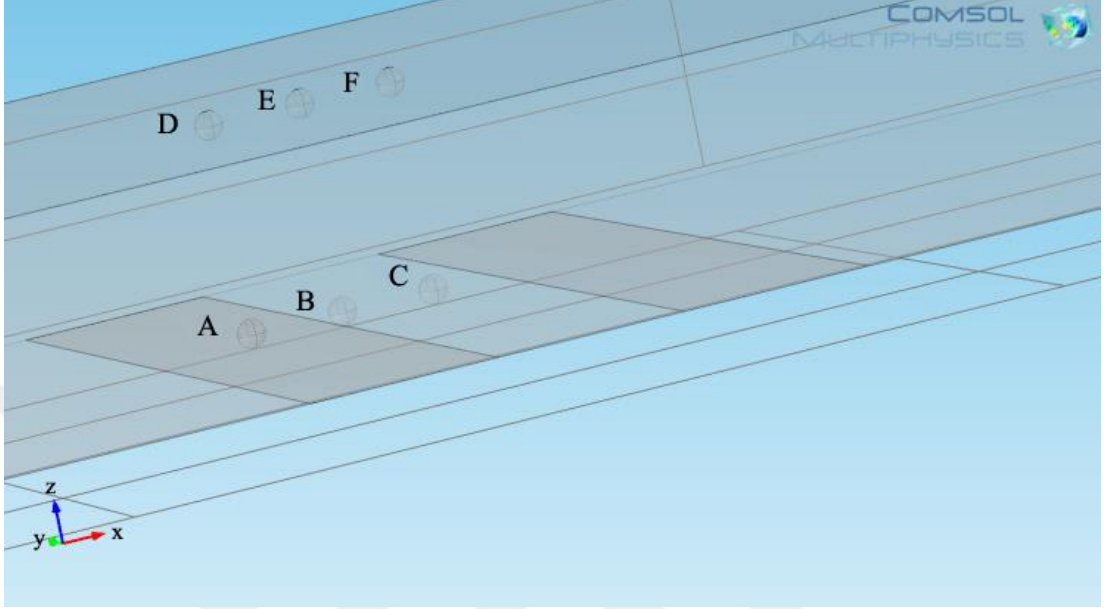
Mikroakışkan çipin geometrik çiziminden sonra materyaller seçilir. Böylece materyallerin elektriksel iletkenliği ve geçirgenliği gibi gerekli fiziksel parametreleri sağlanır. Sonrasında meshing yapılır ve hesaplama başlar. Şekil 3.6.’da çözeltinin fiziksel özellikleri gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Comsol Multiphysics’de hesaplanan a) Elektrik alan değişimi diyagramı b) Yük diyagramı

Comsol Multiphysics’de ilk olarak elektrotların konumunu belirlemek için parçacığın verdiği sinyal ile ilişkisi araştırılmıştır. Algılama bölgesi boyunca farklı konumlara polistiren bir parçacığın elektriksel özelliklerine sahip $6 \mu\text{m}$ çapındaki mikro küreler yerleştirilmiş ve empedans sinyalleri karşılaştırılmıştır. Şekil 3.7.’de

mikro kürelerin konumu gösterilmiştir. Çizelge 3.1.'de mikro kürelerin konumuna göre verdiği sinyaller verilmiştir.

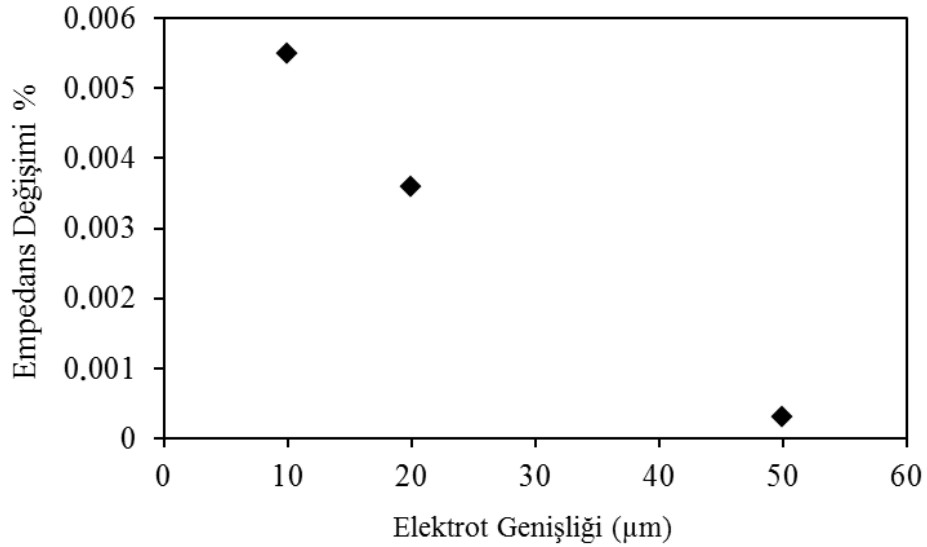


Şekil 3.7. Mikro kürenin mikro kanal içerisindeki konumları

Çizelge 3.1. Mikro kürenin kanal içerisindeki konumuna göre hesaplanan empedans sinyalleri

Mikro kürenin konumu	Empedans Değişimi (Ω)
A	0.3
B	3.3
C	1.4
D	0.12
E	0.3
F	0.4

Comsol Multiphysics sonuçları, en büyük empedans değişiminin parçacığın elektrotun tam ucundan geçerken elde edildiğini gösteriyor. Ayrıca parçacığın elektrotlara yakın noktalardan geçerken algılanma hassasiyeti daha yüksektir. Maxwell'in mixture teorisine göre empedans değişimi, elektro aktif bölgede yer değiştiren parçacığın hacmi ile orantılıdır [64]. Bu yüzden Comsol Multiphysics'de yapılan simülasyon, aynı kanal geometrisi ile 10, 20 ve 50 μm genişliğindeki elektrotlar içinde uygulanmıştır. Burada her bir sensör için elektrotlar arası mesafe elektrot genişliği ile aynı boyuta sahiptir. Elektrot genişliği (w), elektrotlar arası mesafe (g) $w/g=1$ dir. 6 μm çapındaki mikro küreler ile yeni tasarlanan mikroakışkan çiplerde yeniden hesaplamalar yapılmıştır. Mikro küreler yüzeyden 3.1 μm yükseklikte elektrotların tam ortasına yerleştirilmiştir. Şekil 3.8.'de gösterildiği gibi sonuçlar Maxwell mixture teorisi ile uyumludur.

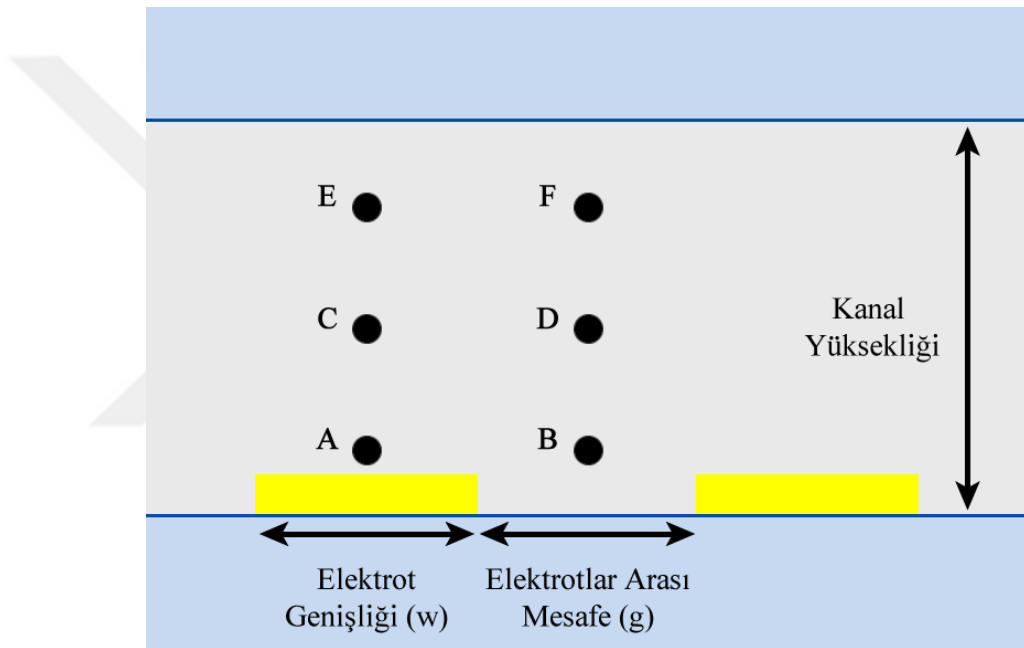


Şekil 3.8. 10-20-50 μm genişliğindeki elektrotlarda yapılan hesaplamalar

Elektrot boyutu büyüdükçe, empedans sinyali elektro aktif bölgeye ve mikro kürenin hacimsel oranına bağlı olarak düşmektedir. Empedans değişimi mikro parçacığın elektrik alan çizgilerini engellemesi ile oluşur. Elektrik alanını daha dar bir bölgeye

sınırlamak ve parçacığın elektrik alanının yoğun olduğu noktalardan geçmesini sağlamak daha yüksek empedans değişimine olanak sağlar [124].

Mikro kürelerin daha küçük elektro aktif bölgede hareket etmesi iki yol ile mümkündür. Biri elektrot boyutunu düşürmek diğeri ise mikro kanalın kesit boyutlarını düşürmektir. Mikroakışkan sistemin hassasiyetini artırmak için küçük boyutlu mikroçiplerin üretiminden önce Comsol Multiphysics’de simülasyonları yapılmıştır.



Şekil 3.9. Mikro kürenin kanal içerisindeki konumlarının kesit görüntüsü

Comsol Multiphysics’deki hesaplamalar önce elektrot boyutu sabit tutularak farklı kanal boyutlarına göre, sonrasında kanal boyutu sabit tutularak farklı elektrot boyutlarına göre yapılmıştır. Şekil 3.9.’da 6 μm çapındaki mikro kürenin kanal içerisindeki konumları gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Mikro kürenin kanal içerisindeki farklı konumlarda kanal boyutuna bağlı Comsol Multiphysics’de hesaplanan empedans sinyalleri

Mikro Kürenin Konumu	Empedans Değişimi (100 μm kanal)	Empedans Değişimi (70 μm kanal)
A	93.4 Ω	151.3 Ω
B	112.5 Ω	168.4 Ω
C	89.6 Ω	148.1 Ω
D	106.7 Ω	162.1 Ω
E	86.8 Ω	144.2 Ω
F	98.7 Ω	158.4 Ω

Çizelge 3.2. Kanal boyutuna bağlı 6 μm çapındaki mikro kürenin kanal içerisinde farklı konumlardaki empedans değişimini göstermektedir. Burada mikroakışkan çip, 20 μm elektrot genişliğine ve elektrotlar arası mesafeye sahip mikro sensör üzerine 10 μm yüksekliğine sahip 100 ve 70 μm genişliğindeki mikro kanallar entegre edilerek tasarlanmıştır.

Çizelge 3.3. Mikro kürenin kanal içerisindeki farklı konumlarda elektrot boyutuna bağlı Comsol Multiphysics’de hesaplanan empedans sinyalleri

Mikro Kürenin Konumu	Empedans Değişimi (20 μm elektrot)	Empedans Değişimi (10 μm elektrot)
A	152.3 Ω	177.9 Ω
B	172.4 Ω	192.5 Ω
C	147.4 Ω	174.0 Ω
D	165.8 Ω	186.3 Ω
E	144.2 Ω	171.6 Ω
F	159.7 Ω	182.2 Ω

Çizelge 3.3. Elektrot boyutuna bağlı 6 µm çapındaki mikro kürenin kanal içerisinde farklı konumlardaki empedans değişimini göstermektedir. Burada mikroakışkan çip, 10 ve 20 µm elektrot genişliğine sahip mikro sensörler üzerine 10 µm yüksekliğinde ve 70 µm genişliğinde mikro kanal entegre edilerek tasarlanmıştır.

Comsol Multiphysics’de yapılan hesaplamalar, kanal ve elektrot boyutları azaldığında 6 µm çapındaki bir mikro küreden alınan empedans sinyalinin arttığını göstermektedir. Bu bilgilerden yola çıkarak daha küçük boyutlara sahip mikro elektrotlar ve mikro kanallar üretilmiştir.

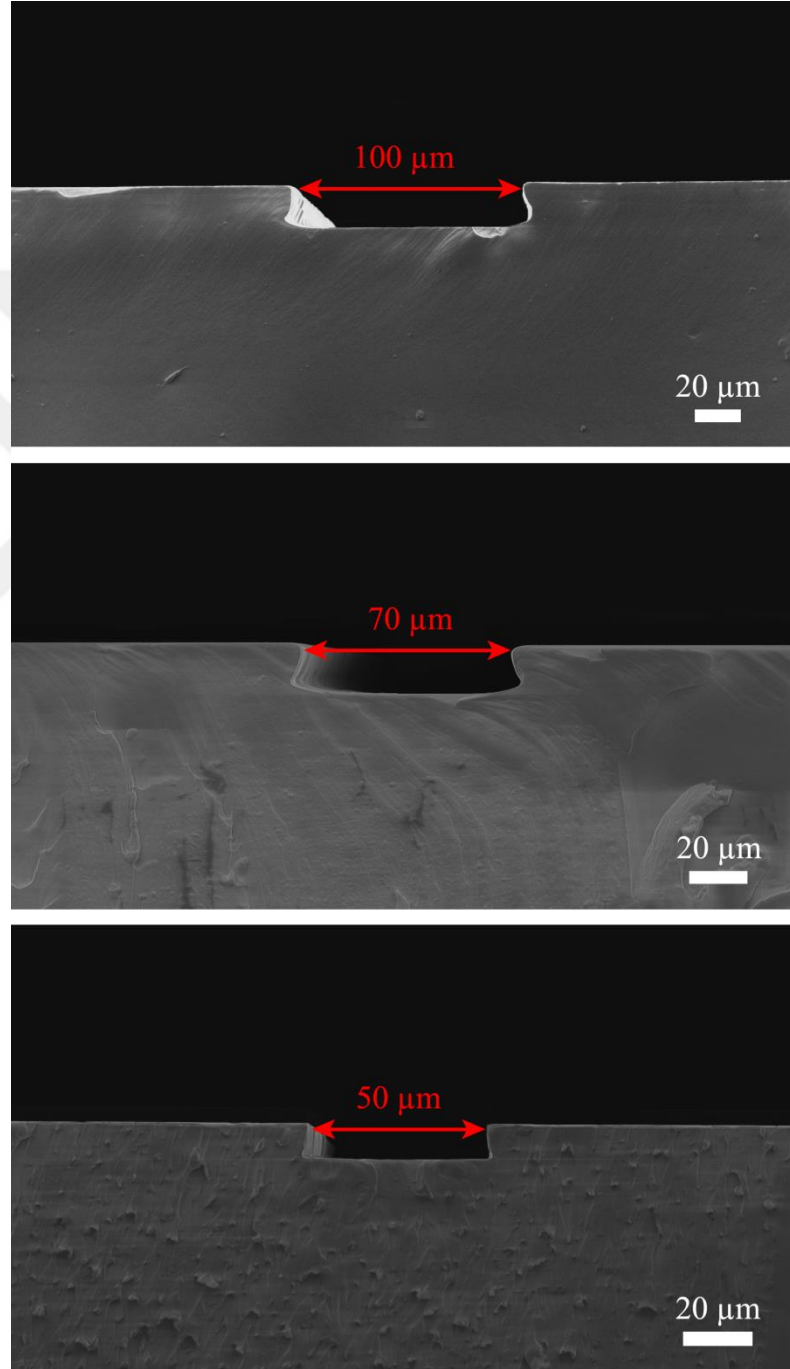
3.3. Farklı Boyutlardaki Mikroçiplerde Mikro Parçacık Tespiti

Empedans değişimi mikro parçacığın elektrik alan çizgilerini engellemesi ile olduğundan elektrik alanını daha dar bir bölgeye sınırlamak ve parçacığın elektrik alanının yoğun olduğu noktalardan geçirmek daha yüksek empedans değişimine olanak sağlamaktadır. Böylece yüksek hassasiyette parçacık tespiti yapılabilir ve farklı boyutlardaki mikro parçacıklar ayırt edilebilir. Comsol Multiphysics’de yapılan hesaplamalar bu bilgileri doğrulamaktadır.

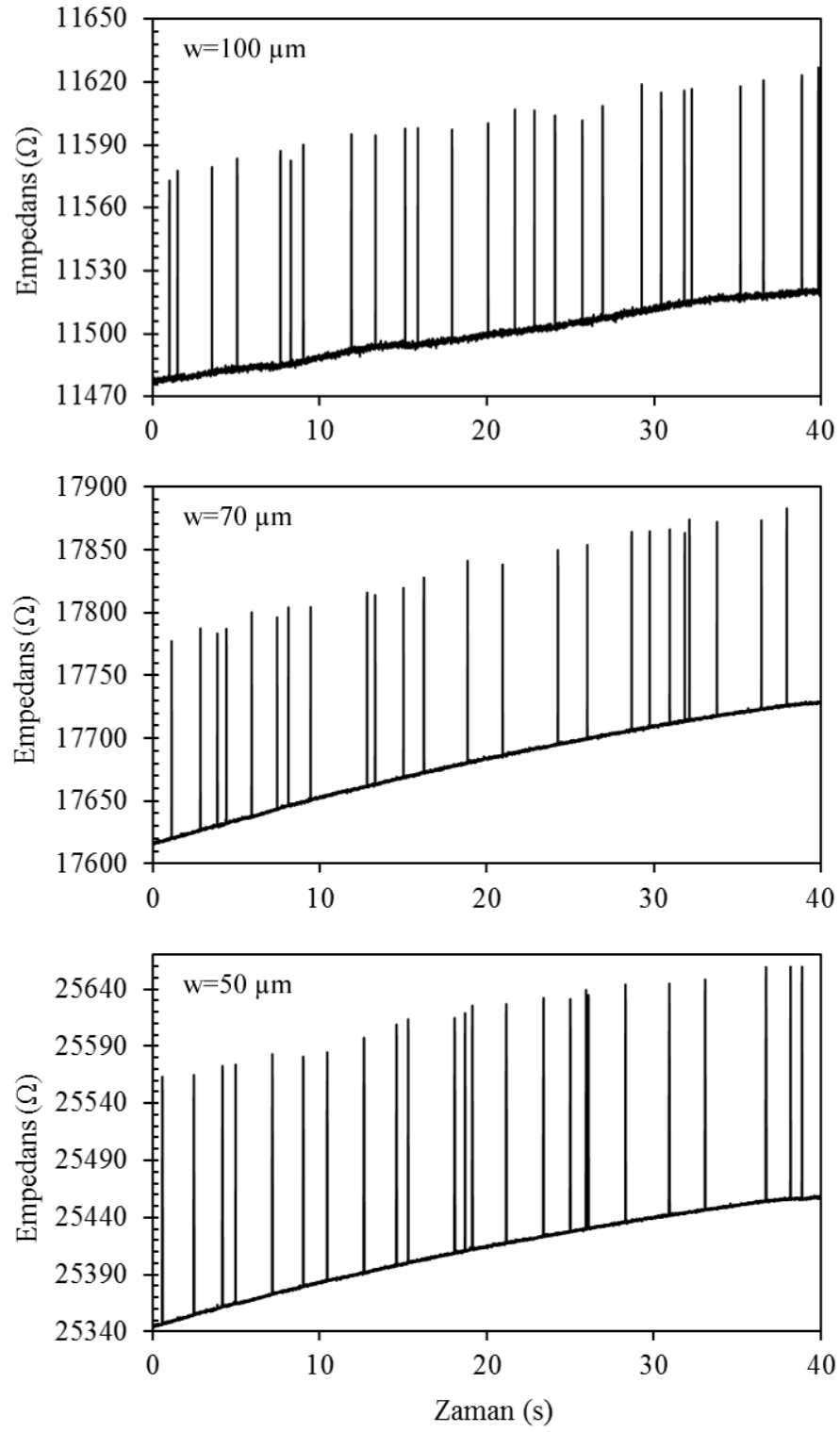
Comsol Multiphysics’de yapılan hesaplamalar ile ölçüm sistemimizin hassasiyetini kıyaslayabilmek için yeni düşük boyutlu mikro elektrotlar ve mikro kanallar üretilmiştir. En uygun kanal ve elektrot geometrisini bulabilmek için öncelikle elektrot boyutu sabit tutularak farklı kanal boyutlarındaki mikroçiplerde, daha sonra kanal boyutu sabit tutularak farklı elektrot boyutlarındaki mikroçiplerde deneyler yapıldı. Yeni düşük boyutlu mikro kanallarda bir mikro küreden alınacak empedans sinyalinin artması beklenmektedir.

3.3.2. Kanal Boyutuna Bağlı Mikro Parçacık Tespiti

Düşük boyutlu mikro kanalların SEM de alınmış kesit görüntüleri Şekil 3.10.'da gösterilmiştir.

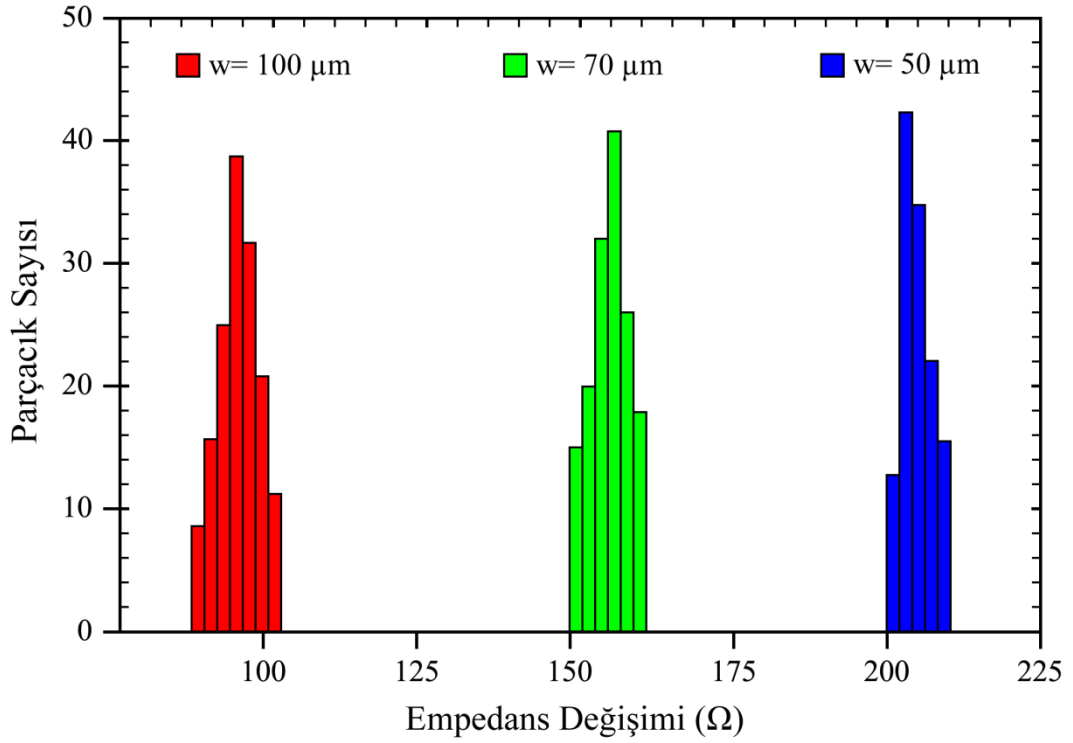


Şekil 3.10. Düşük boyutlu mikro kanalların SEM de alınan kesit görüntüleri



Şekil 3.11. 6 μm çapındaki mikro kürelerin kanal genişliğine bağlı empedans verileri

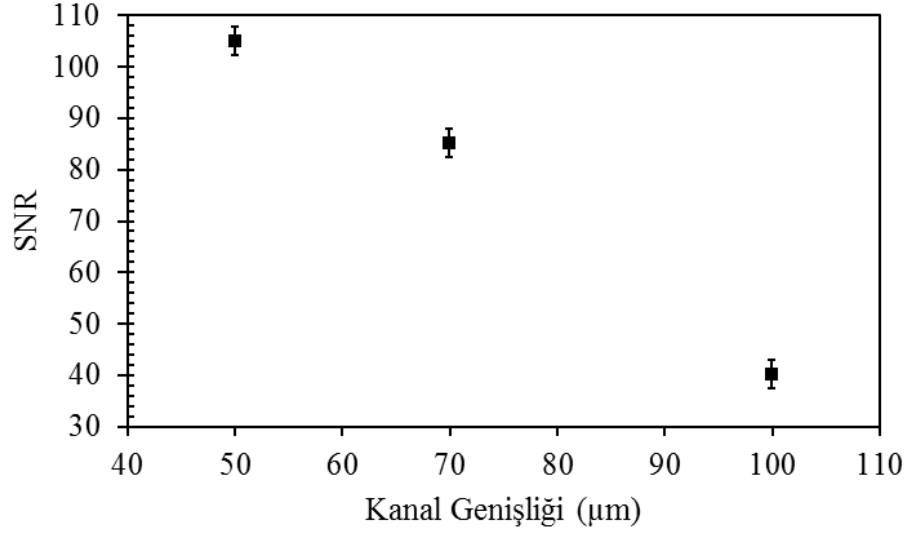
6 μm çapındaki polistiren mikro kürelerin her bir mikroçipten elde edilen empedans verileri ekil 3.11.'de gösterilmiştir. Buradaki her bir pik elektrotların üzerinden geçen mikro küreleri temsil etmektedir. Kanal genişliği azaldıkça ölçüm sisteminde okunan empedans değeri artmaktadır. Böylece mikro kürelerin elektro aktif bölgeden geçerken oluşturdukları empedans değişimi artmaktadır.



Şekil 3.12. 6 μm çapındaki mikro kürelerin farklı kanal genişliklerindeki empedans değişimine bağlı histogram grafiği

Şekil 3.12.'de 6 μm çapındaki mikro kürelerin farklı kanal genişliklerindeki empedans değişimine bağlı histogram grafiği gösterilmiştir. Kanal genişliği azaldıkça ölçüm sisteminin hassasiyeti artmaktadır. Bu açıdan dar kanallar kullanılarak daha düşük boyuta sahip mikro kürelerin tespiti mümkün olacaktır.

Kanal genişliğine bağlı alınan sonuçlara göre hesaplanan sinyal/gürültü oranı Şekil 3.13.'de gösterilmiştir. Kanal genişliği azaldıkça bir mikro küreden alınan empedans sinyali ve SNR oranı artmaktadır.



Şekil 3.13. Kanal genişliğine bağlı sinyal/gürültü oranı

Çizelge 3.4. 6 μm çapındaki bir mikro kürenin kanal geometrisine bağlı mikroakışkan sistemde oluşturduğu empedans değişiminin deneysel ve Comsol Multiphysics'de yapılan hesaplamaların karşılaştırmasını göstermektedir. Comsol Multiphysics hesaplamaları mikroakışkan sistemde 6 μm çapındaki bir mikro küreden alınabilecek minimum ve maksimum empedans sinyali değerlerini göstermektedir. Deneysel sonuçların Comsol Multiphysics'de hesaplanan bu minimum ve maksimum değerleri arasında olması gerekmektedir. Çizelge 3.4. incelendiğinde, Comsol Multiphysics'de yapılan hesaplamaların deneysel sonuçları doğruladığı görülmektedir.

Çizelge 3.4. Kanal genişliğine bağlı alınan deneysel sonuçların teorik hesaplamalar ile karşılaştırılması

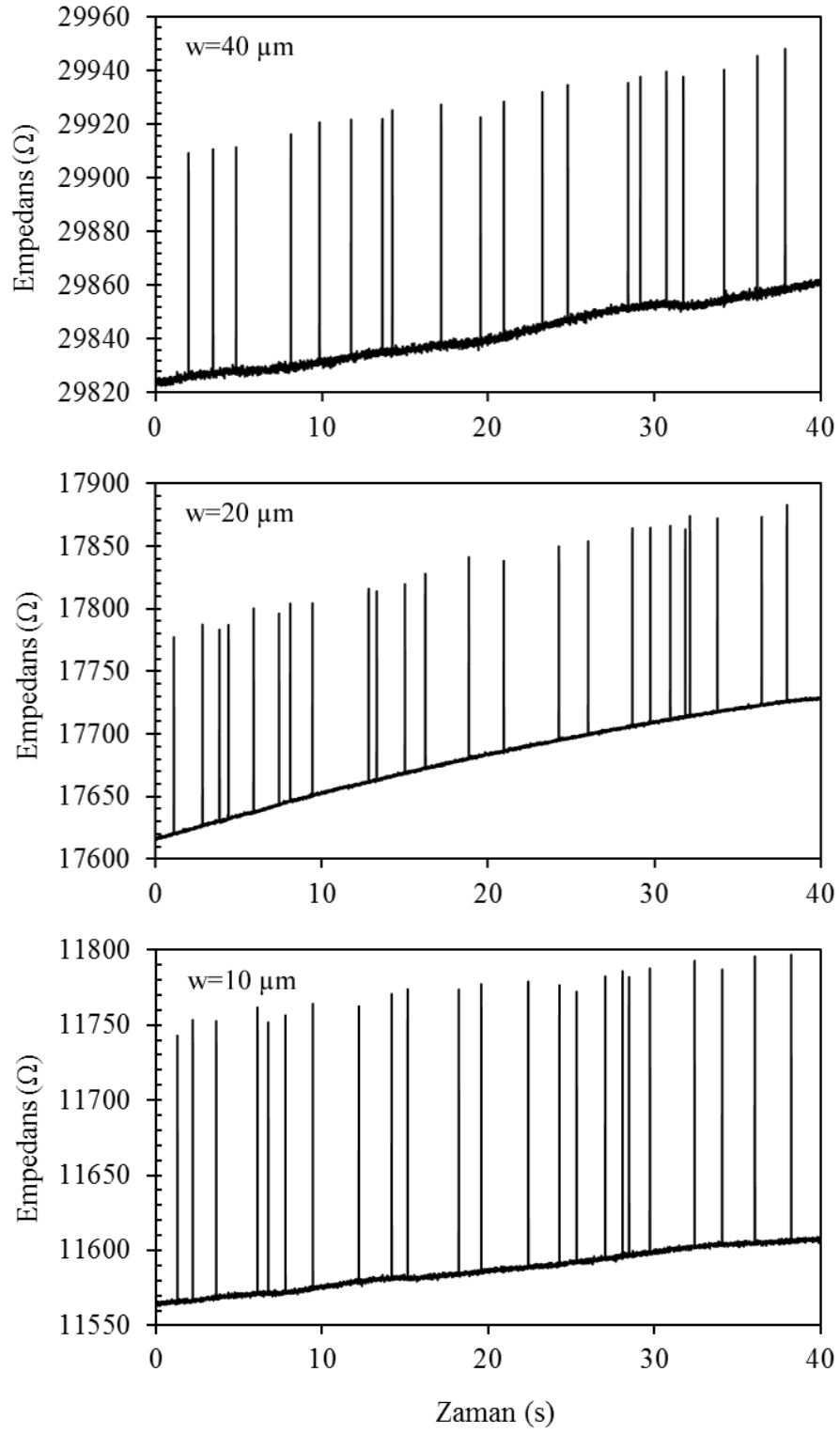
Kanal Genişliği	Empedans Değişimi (Deneysel)	Empedans Değişimi (Comsol Multiphysics)
100 μm	88-103 Ω	84.8-110.5 Ω
70 μm	150-162 Ω	144.2-172.4 Ω
50 μm	200-210 Ω	188.3-214.5 Ω

3.3.3. Elektrot Boyutuna Bağlı Mikro Parçacık Tespiti

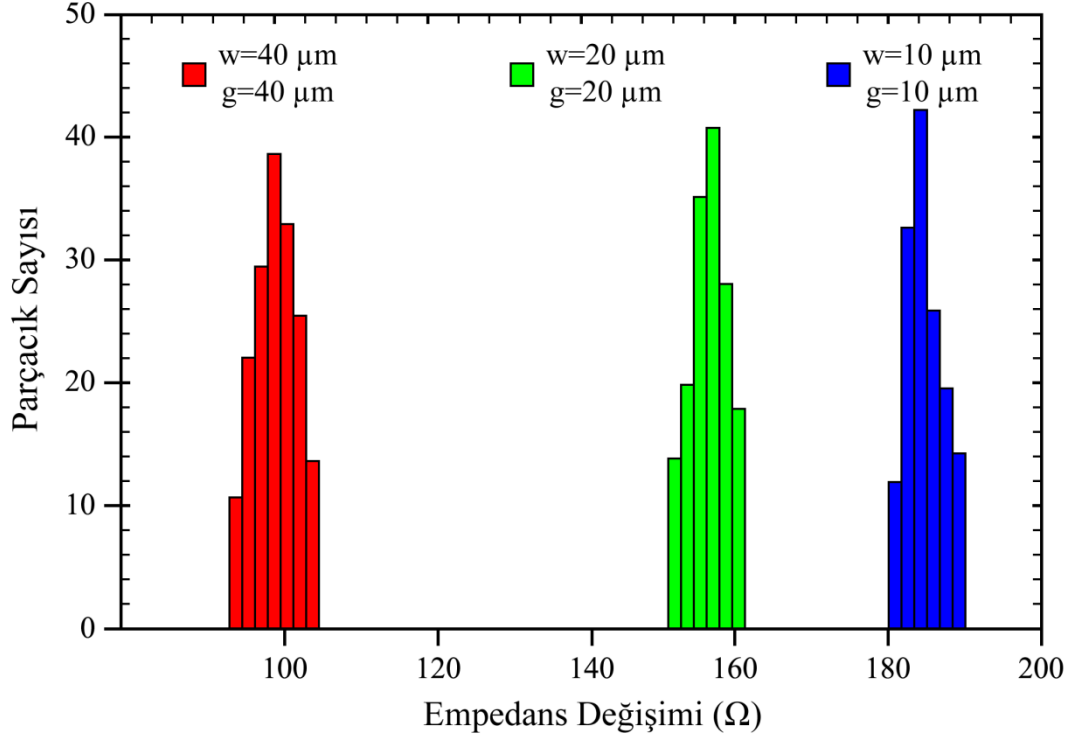
6 μm çapındaki polistiren mikro kürelerin her bir mikroçipten elde edilen empedans verileri Şekil 3.14.'de gösterilmiştir.

Elektrot geometrisine bağlı mikro parçacık tespiti deneylerinde kanal yüksekliği 10 μm ve kanal genişliği 70 μm olan mikro kanallar kullanılmıştır. Elektrot genişliği sırası ile 40, 20 ve 10 μm dir. Burada elektrot genişliği (w), elektrotlar arası mesafe (g) $w/g=1$ dir.

Şekil 3.14.'den de görüldüğü gibi elektrot genişliği ve elektrotlar arası mesafe azaldığında 6 μm çapındaki polistiren bir mikro küreden alınan empedans değeri artmaktadır. Elektrot boyutunun büyümesi, empedans sinyalini elektro aktif bölgeye ve mikro kürenin hacimsel oranına bağlı olarak düşürmektedir. Elektrik alanını daha dar bir bölgeye sınırlamak ve parçacığın elektrik alanının yoğun olduğu noktalardan geçmesini sağlamak daha yüksek empedans değişimine olanak sağlar [124].



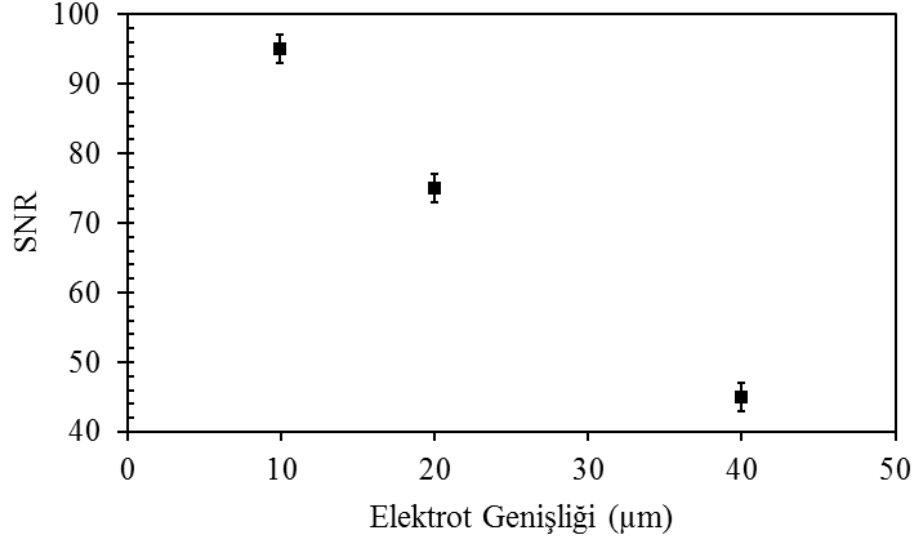
Şekil 3.14. 6 μm çapındaki mikro kürelerin elektrot genişliğine bağlı empedans verileri



Şekil 3.15. 6 μm çapındaki mikro kürelerin farklı elektrot geometrisindeki empedans değişimine bağlı histogram grafiği

Şekil 3.15.'te 6 μm çapındaki mikro kürelerin farklı elektrot geometrisindeki empedans değişimine bağlı histogram grafiği gösterilmiştir. Elektrot genişliği azaldıkça ölçüm sisteminin hassasiyeti artmaktadır. Böylece dar elektrotlar kullanılarak daha düşük boyuta sahip mikro kürelerin tespiti mümkün olacaktır.

Elektrot geometrisine bağlı alınan sonuçlara göre hesaplanan sinyal/gürültü oranı Şekil 3.16.'da gösterilmiştir. Elektrot genişliği ve elektrotlar arası mesafe azaldıkça bir mikro küreden alınan empedans sinyali ve SNR oranı artmaktadır.



Şekil 3.16. Elektrot geometrisine bağlı sinyal/gürültü oranı

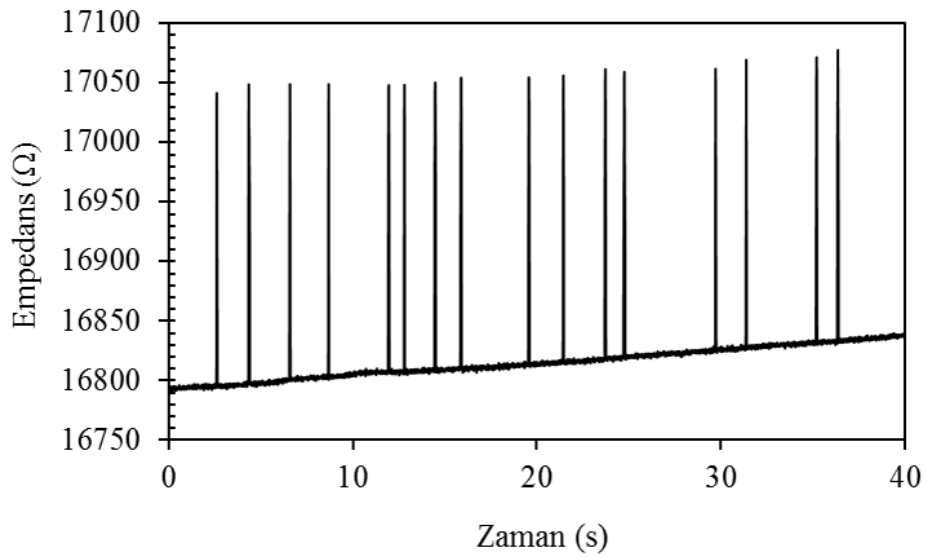
Çizelge 3.5. 6 μm çapındaki bir mikro kürenin kanal geometrisine bağlı mikroakışkan sistemde oluşturduğu empedans değişiminin deneysel ve teorik hesaplamalarının karşılaştırmasını göstermektedir. Çizelge 3.5. incelendiğinde, Comsol Multiphysics’de yapılan hesaplamaların deneysel sonuçları doğruladığı görülmektedir.

Çizelge 3.5. Elektrot geometrisine bağlı alınan deneysel sonuçların teorik hesaplamalar ile karşılaştırılması

Elektrot Genişliği	Empedans Değişimi (Deneysel)	Empedans Değişimi (Comsol Multiphysics)
40 μm	92-105 Ω	86.8-113.5 Ω
20 μm	150-162 Ω	144.2-172.4 Ω
10 μm	180-190 Ω	171.6-192.5 Ω

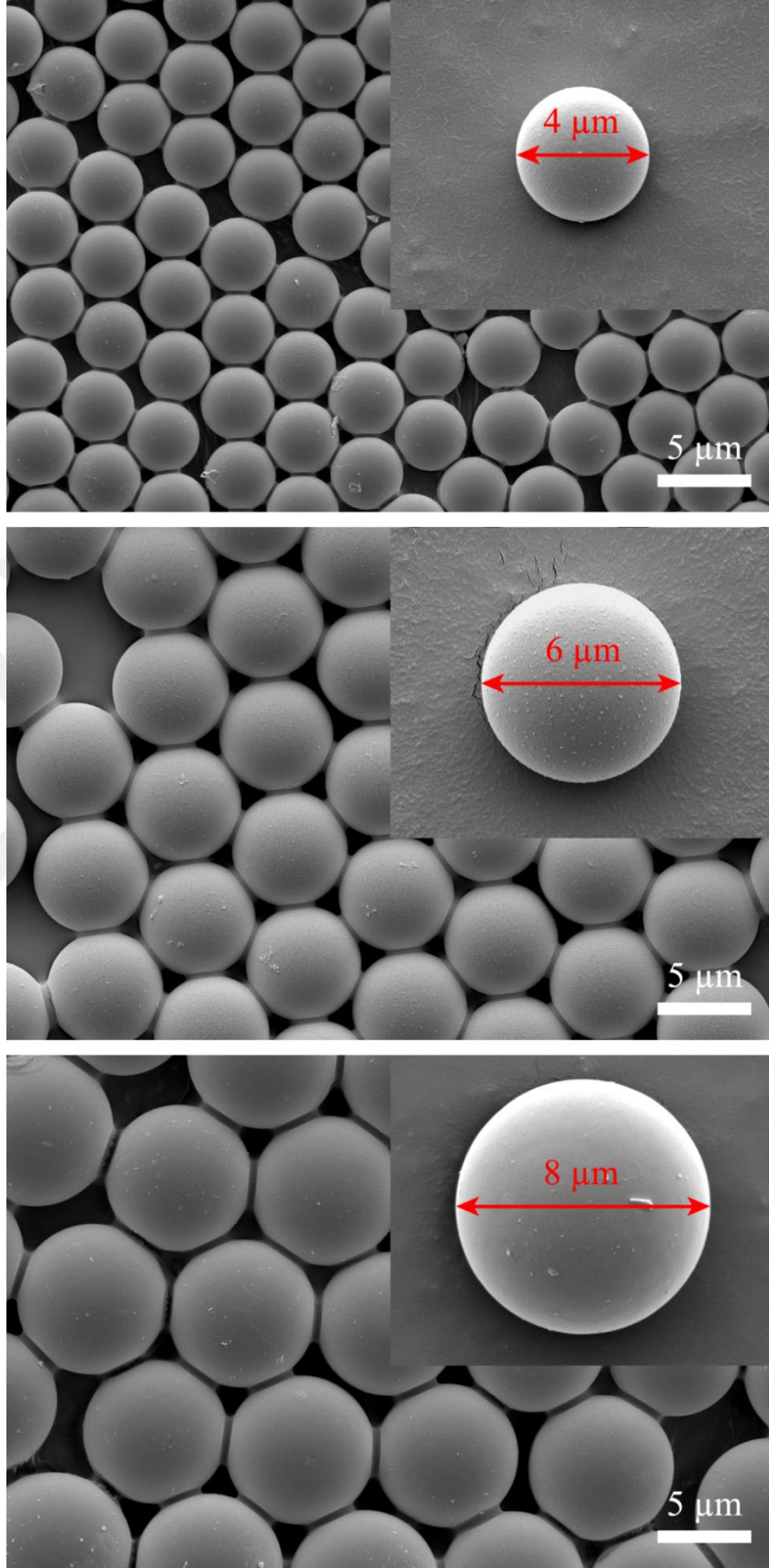
3.5. Farklı Boyutlardaki Mikro Parçacıkların Ayırt Edilmesi

Comsol Multiphysics’de yapılan hesaplamalar ve mikro küre tespiti deneyleri sonucunda yüksek hassasiyette ölçüm yapmaya imkân sağlayan kanal ve elektrot geometrisi belirlendi. Böylece elektrot genişliği ve elektrotlar arası mesafe 10 μm olan sensör üzerine kanal yüksekliği 10 μm ve kanal genişliği 50 μm olan mikro kanal entegre edilmiştir. Belirlenen yeni boyuttaki mikroçip kullanılarak 6 μm çapındaki polistiren mikro kürelerin tespiti yeniden yapılmıştır.



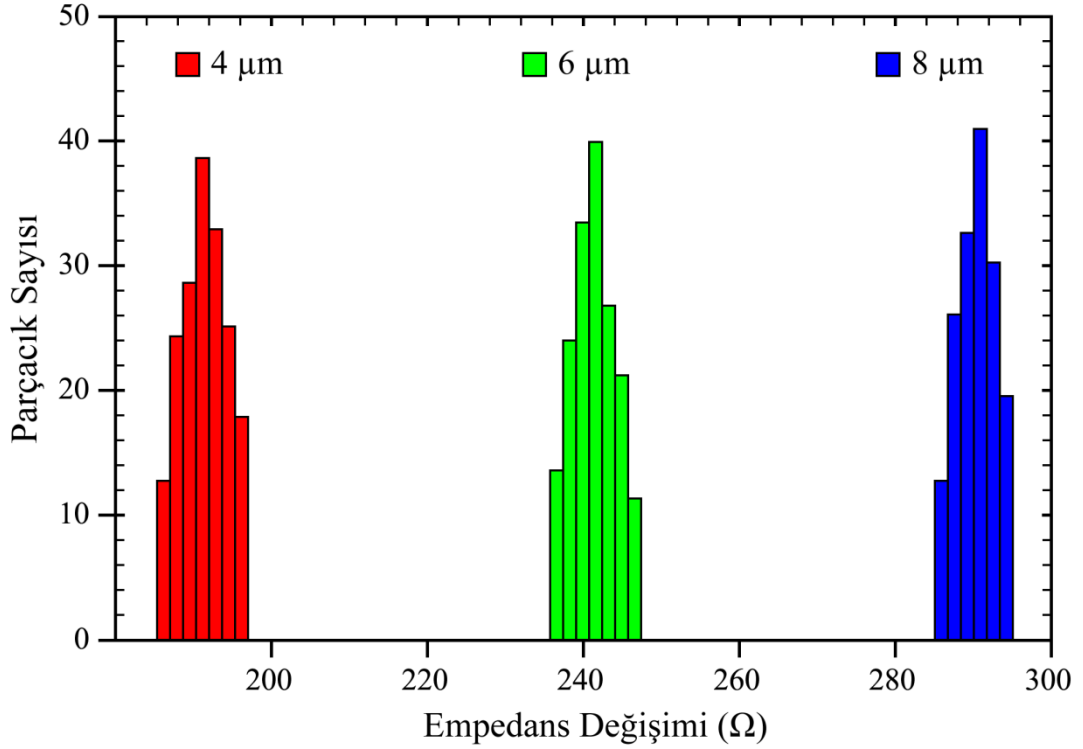
Şekil 3.17. 6 μm çapındaki mikro kürelerin empedans verisi

Şekil 3.17.’de 6 μm çapındaki polistiren mikro kürelerin yeni boyuttaki mikroçipten alınan empedans verileri gösterilmiştir. Ölçüm sistemi düzeneği 6 μm çapındaki polistiren mikro kürelerin tespitinde çok yüksek hassasiyet göstermektedir. Buradan yola çıkarak deneyler 4, 6 ve 8 μm çaplarındaki polistiren mikro kürelerin ayırt edilebilmesi için genişletilmiştir. Şekil 3.18.’de 4, 6 ve 8 μm çapındaki polistiren mikro kürelerin SEM de alınan görüntüleri gösterilmiştir.



Şekil 3.18. 4, 6 ve 8 μm çapındaki polistiren mikro kürelere ait SEM görüntüleri

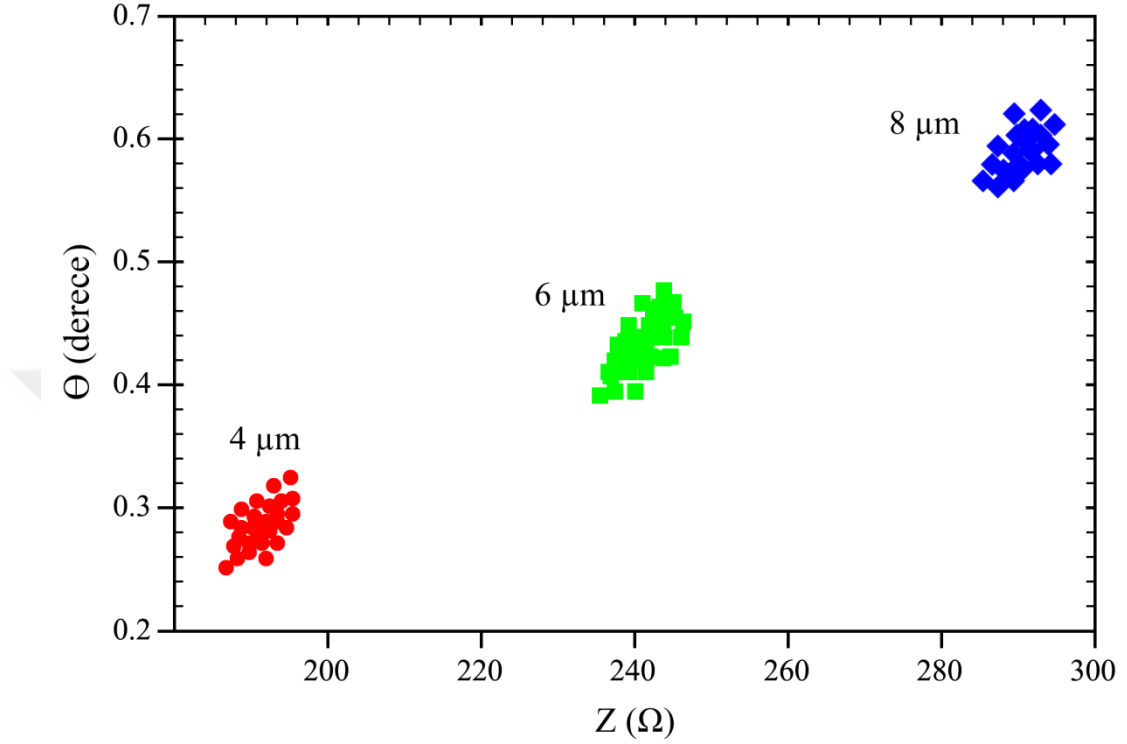
4 ve 8 μm çapındaki polistiren mikro küreler aynı şekilde 2.5 S/m iletkenliğindeki NaCl çözeltisinde mikroakışkan ölçüm sistemine yerleştirilip empedans verileri kaydedilmiştir. Her bir mikro küre için empedans değişimi hesaplanarak şekil 3.19.'da gösterilen 4, 6 ve 8 μm çapındaki mikro kürelere ait histogram grafiği çizilmiştir.



şekil 3.19. 4, 6 ve 8 μm çapındaki polistiren mikro kürelerin empedans değişimine bağlı histogram grafiği

Maxwell mixture teorisine göre, benzer tip parçacıklar kanal içerisindeki konum ve boyutlarına bağlı olarak farklı sinyaller vermektedir [64,125]. Empedans bazlı mikroakışkan sistemimizde 4, 6 ve 8 μm çapındaki mikro küreler açıkça görülmüş ve tespit edilmiştir. Böylece parçacık tespitinde kullanılan iki boyutlu ya da üç boyutlu hidrodinamik ve dielektroforezis (DEP) odaklama teknikleri ile benzer hassasiyette sonuçlar elde edilmiştir [102,103,124,126-129]. şekil 3.20.'de görüldüğü gibi

mikroakışkan sistemimiz 4, 6 ve 8 μm çapındaki polistiren mikro küreleri ayırabilecek hassasiyete sahiptir.



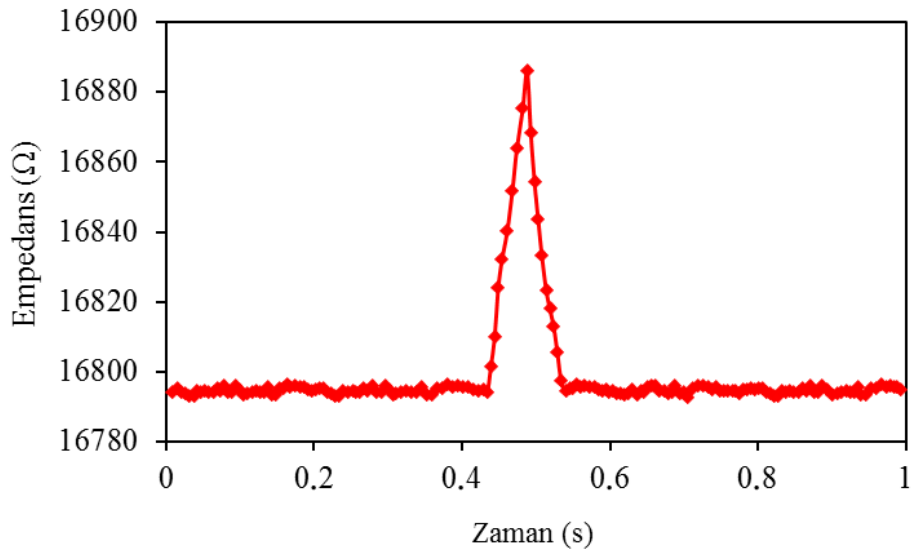
Şekil 3.20. 4, 6 ve 8 μm çapındaki mikro kürelere ait Empedans- Θ grafiği

3.6. Kırmızı Kan Hücresi (RBC) Tespiti

Kan örneği, bilgilendirilen ve onayı alınan bir donörden alınmıştır. Venöz kan bir vakum tüpüne (%3.8 sodyum sitratın 1/9 hacmine) alınmış ve kan çekildikten sonra 4 saat içinde kullanılmıştır. 50 μl kan, 2.5 S/m iletkenliğindeki 10 ml fosfat tamponlu tuzlu suda (PBS) seyreltilmiştir. Çözelti içerisindeki alyuvar (Kırmızı Kan Hücresi-RBC) konsantrasyonu hemositometri ile 2×10^6 hücre/ml olarak ölçülmüştür.

Çözelti bir vial içerisinde yükseklik pompasına yerleştirilir. Basınç pompası ya da şırınga pompası yerine, düşük basınç değerlerinde akış oranı üzerine daha yüksek

hassasiyete sahip yükseklik pompası kullanılır. Metal şırınga bağlantı parçaları kullanılarak kanal ile çözelti arasındaki iletişim sağlanır. Tüm düzenek LCR metre üzerinde bulunan topraklama çıkışı kullanılarak topraklanmıştır. Çözeltinin topraklama işlemi ise metal bağlantı parçaları ile yapılır. Topraklama işleminden sonra ölçüm sistemi düzeneğinde içerisinde, kırmızı kan hücreleri bulunan çözelti kanala gönderilir ve empedans verisi LabVIEW kodu ile kaydedilir.

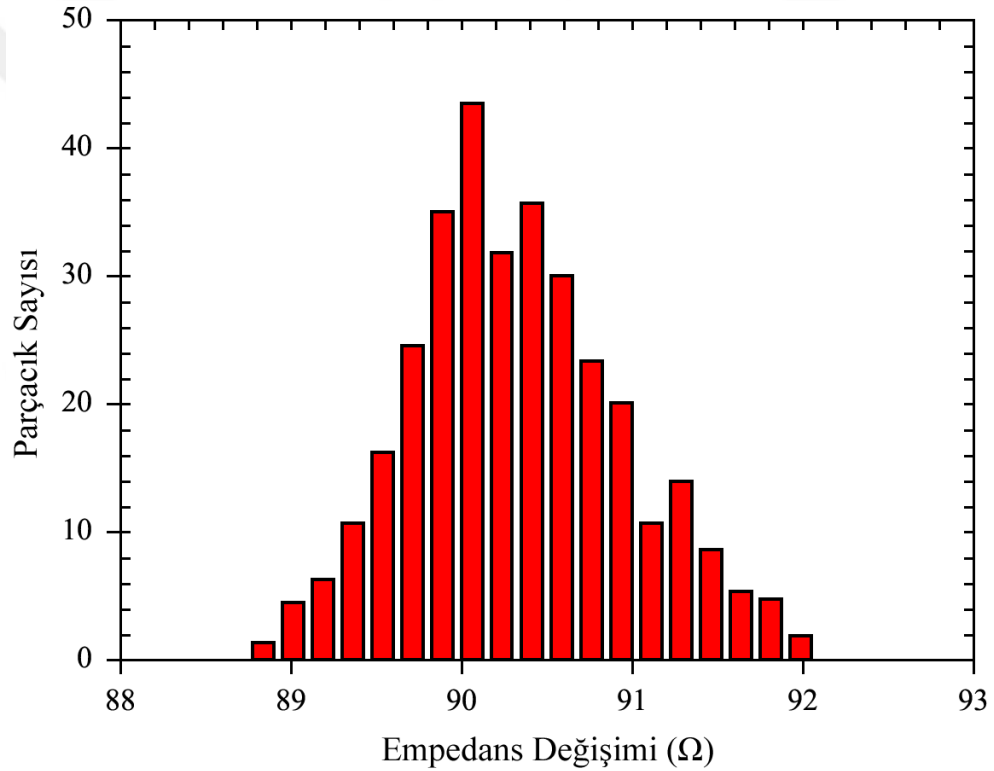


Şekil 3.21. Kırmızı kan hücresi elektrot üzerinden geçtiğinde alınan empedans sinyali

Empedans verisi kaydedilirken elektrotlardan geçen kırmızı kan hücreleri mikroskobun kamerasından incelenir. Böylelikle elektrotlardan geçen kırmızı kan hücrelerinin etkisi empedans grafiğinden gözlemlenir. Şekil 3.21.'de bir tane kırmızı kan hücresine ait empedans sinyali gösterilmiştir.

Kırmızı kan hücresi tespitinde, elektrot genişliği ve elektrotlar arası mesafe 10 μm olan sensör üzerine kanal yüksekliği 10 μm ve kanal genişliği 50 μm olan mikro kanal entegre edilmiş mikroakışkan çip kullanılmıştır. Şekil 3.22.'de kırmızı kan hücrelerinin empedans değişimine bağlı histogram grafiği gösterilmiştir.

Mikroakışkan sistemlerin empedansa dayalı tek hücre analizlerinde çoğunlukla lock-in amplifier ve özel elektronik devreler kullanılır [23,88]. Tek hücre analizlerinde impedimetrik algılama için standart cihazların kullanıldığı çalışma sayısı oldukça azdır [22,92,130]. Bu cihazların kullanıldığı sistemlerde ulaşılan tek hücre algılama hassasiyeti, lock-in amplifier kullanılan sistemlere göre oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada empedans ölçümleri için kullanılan LCR metre cihazının örnekleme hızı, veri toplama kartları sayesinde örnekleme hızının kHz düzeylerinde olan lock-in amplifier sistemlerine göre düşük olmasına rağmen, kırmızı kan hücresi tespitinde aynı hassasiyette sonuçlar alınmıştır [131].



Şekil 3.22. Kırmızı kan hücrelerinin empedans değişimine bağlı histogram grafiği

4. SONUÇLAR

Mikro akışkan teknolojisi, bazı fiziksel olguların ve öngörülerin incelenmesi, kimyasal ve biyolojik analiz, hasta başında ve hastaya özel teşhis, özel reaktörler ve lab on a chip gibi birçok uygulamanın yapılabilmesini sağlayan bir teknolojidir. Mikro sistemlerde biyoçipler kullanılarak biyoanaliz ve biyolojilama gibi pek çok pratik uygulama vardır. Geliştirilen sistemlerde virüs saptanmasının hızlı ve bu virüslerin doğrudan analizi yapılabilir.

Mikroakışkan tek hücre analiz sistemleri tek hücrenin sayımı, tuzaklanması, odaklanması, ayrılması, sınıflandırılması, karakterize edilmesi ve tanımlanması için teknolojik çözümler gerektirir. Hücrelerin büyük bir kısmının hacim yoğunluk ölçüleri ortalama bir bilgi sağlarken, şekil olarak aynı görülen tek hücreler genellikle heterojen bir tutuma sahiptir. Bu yüzden bu tez çalışmasında hücrelerin sayımı, tanımlanması ve sınıflandırılması için iyi bir teknik olan empedans akış sitometrisi tekniği geliştirilmiştir.

Bu çalışmada empedansa dayalı bir mikroakışkan sistem üretilmiştir. Üretilen bu sistemden mikro parçacık taşıyan bir sıvı geçirilerek, sıvı içerisindeki mikro parçacıklar tespit edilmiştir. Bu sistemde eş düzlemsel mikro elektrotlardan oluşan sensörler kullanılmıştır. Eş düzlemsel mikro elektrotlardan kaynaklanan homojen olmayan elektrik alan dağılımı empedansta varyasyonlara sebep olmaktadır. Kanaldaki farklı konumlarda akan aynı boyuta sahip parçacıklar farklı elektrik alan kuvvetiyle karşılaşır ve farklı empedans sinyalleri meydana getirirler. Eş düzlemsel mikro elektrotlardan kaynaklanan empedans varyasyonlarını minimum seviyeye indirmek ve mikroakışkan sistemin hassasiyetini artırmak için sonlu elemanlar metodu ile simülasyonlar yapılarak mikro parçacık tespiti sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Bu sonuçlardan yola çıkılarak farklı boyutlardaki elektrot ve kanalların performansı teorik ve deneysel olarak incelenmiştir. Elektrot ve kanal boyutu azaldıkça 6 μm çapındaki bir polistiren mikro kürenin oluşturduğu empedans değişimi değerinin arttığı görülmüştür. Bu sonuçlara göre, 4, 6 ve 8 μm çaplarındaki polistiren mikro kürelerin yüksek hassasiyette ayırt edilebildiği düşük boyutta

elektrot ve kanal sistemleri geliştirilmiştir. Düşük boyuttaki mikroakışkan çiplerde mikro kürelerden alınan empedans sinyalleri artmakta ve empedans varyasyonları minimum seviyeye inmektedir. Ancak düşük boyuttaki mikroakışkan çiplerde kanalların tıkanma gibi bir dezavantajı vardır. Bu problemi çözmek için mikro kanalı sensör üzerine plazma uygulayarak geri döndürülemez biçimde [132] bağlamak yerine “Tekrar Kullanılabilir Bağlanma Yöntemi” [123] geliştirilmiştir. Mikro kanallar Pleksi kullanılarak sensör üzerine vidalar yardımıyla sabitlenmiştir. Böylece herhangi bir tıkanma durumunda kanalı kaldırıp temizleyip tekrar kullanılabilecek bir sistem geliştirilmiştir.

Mikroakışkan sistemde empedans ölçümleri için bir devrenin üç temel parametresini ölçebilen LCR metre cihazı kullanılmıştır. LCR metre cihazında, LabVIEW kodu ile bir masaüstü bilgisayar kullanılarak 184 Hz’lik örnekleme hızına ulaşıldı. Böylece LCR metrenin kullanıldığı daha önceki çalışmalara göre örnekleme hızında yaklaşık 4 kat artış sağlanmıştır [130]. Aynı zamanda bu örnekleme hızı, veri toplama kartları sayesinde örnekleme hızının kHz düzeylerinde olan lock-in amplifier sistemlerine göre düşük olmasına rağmen, farklı boyutlara sahip parçacıkların tespitinde ve ayırt edilmesinden yüksek hassasiyette sonuçlar vermiştir. Lock-in amplifier sistemlerine göre LCR metre ile ölçüm yapmak için herhangi bir devreye gerek yoktur. LCR metrenin tek çalıştır bir sistem olması en büyük avantajıdır.

Ticari hücre sınıflandırma cihazları saniyede binlerce hücre analizi yapabilir fakat genellikle küçük bir örnek hacminin kullanımı için uygun olmayan pahalı, komplike makinalardır. Bu tez çalışmasında bunların yerine empedansa dayalı mikroakışkan sistem kullanılarak alınan çok az bir kan örneğindeki kırmızı kan hücreleri sayılmış ve kan örneğindeki farklı mikro parçacıklar tespit edilmiştir. Bu sayede hem çok az miktarda kan ile çalışabilen bir hemogram cihazı hem de kanser çalışmalarında çok önemli olan dolaşımdaki tümör hücrelerinin algılanmasının yapılabileceği bir teknoloji geliştirilmiştir. Böylelikle özelleşmiş kan hastalıklarının tespitine yönelik portatif sistemlerin geliştirilebileceği gösterilmiştir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Zourob, M., S. Elwary, A.P. Turner, Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems: Biosensors, Recognition Receptors, and Microsystems. Springer Science & Business Media: 2008.
- [2] Clark, L.C., C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of sciences* 102(1): 29-45, 1962.
- [3] Updike, S., G. Hicks, The enzyme electrode. *Nature* 214: 986-988, 1967.
- [4] Hallek, M., B.D. Cheson, D. Catovsky, F. Caligaris-Cappio, G. Dighiero, H. Döhner, P. Hillmen, M.J. Keating, E. Montserrat, K.R. Rai, Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. *Blood* 111(12): 5446-5456, 2008.
- [5] Myszka, D.G., Survey of the 1998 optical biosensor literature. *Journal of Molecular Recognition* 12(6): 390-408, 1999.
- [6] Lavrik, N.V., M.J. Sepaniak, P.G. Datskos, Cantilever transducers as a platform for chemical and biological sensors. *Review of scientific instruments* 75(7): 2229-2253, 2004.
- [7] Lee, S.-H., D.D. Stubbs, J. Cairney, W.D. Hunt, Rapid detection of bacterial spores using a quartz crystal microbalance (QCM) immunoassay. *Sensors Journal, IEEE* 5(4): 737-743, 2005.
- [8] Adams, J.r., G.S. Bodor, V.G. Davila-Roman, J. Delmez, F. Apple, J. Ladenson, A.S. Jaffe, Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation* 88(1): 101-106, 1993.
- [9] Berthier, J., P. Silberzan, Microfluidics for biotechnology. Artech House: 2010.

- [10] Bruus, H., Theoretical microfluidics. New York: Oxford University Press, 2008.
- [11] Gomez, F.A., Biological applications of microfluidics. John Wiley & Sons: 2008.
- [12] Brown, R.B., J. Audet, Current techniques for single-cell lysis. *Journal of The Royal Society Interface* 5: 131-138, 2008.
- [13] Chao, T.-C., A. Ros, Microfluidic single-cell analysis of intracellular compounds. *Journal of The Royal Society Interface* 5: 139-150, 2008.
- [14] Davey, H.M., D.B. Kell, Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiological reviews* 60(4): 641-696, 1996.
- [15] Shapiro, H.M., The evolution of cytometers. *Cytometry Part A* 58(1): 13-20, 2004.
- [16] Höber, R., Eine Methode, die elektrische Leitfähigkeit im Innern von Zellen zu messen. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* 133(4-6): 237-253, 1910.
- [17] Höber, R., Ein zweites Verfahren, die Leitfähigkeit im Innern von Zellen zu messen. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* 148(4-5): 189-221, 1912.
- [18] Höber, R., Messungen der inneren Leitfähigkeit von Zellen. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 150(1): 15-45, 1913.
- [19] Curtis, H.J., K.S. Cole, Transverse electric impedance of *Nitella*. *The Journal of general physiology* 21(2): 189-201, 1937.
- [20] Zhe, J., A. Jagtiani, P. Dutta, J. Hu, J. Carletta, A micromachined high throughput Coulter counter for bioparticle detection and counting. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 17(2): 304, 2007.

- [21] Nieuwenhuis, J.H., F. Kohl, J. Bastemeijer, P.M. Sarro, M.J. Vellekoop, Integrated Coulter counter based on 2-dimensional liquid aperture control. *Sensors and Actuators B: Chemical* 102(1): 44-50, 2004.
- [22] Ayliffe, H.E., A.B. Frazier, R. Rabbitt, Electric impedance spectroscopy using microchannels with integrated metal electrodes. *Microelectromechanical Systems, Journal of* 8(1): 50-57, 1999.
- [23] Gawad, S., L. Schild, P. Renaud, Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing. *Lab on a Chip* 1(1): 76-82, 2001.
- [24] Cole, M.C., P.J. Kenis, Multiplexed electrical sensor arrays in microfluidic networks. *Sensors and Actuators B: Chemical* 136(2): 350-358, 2009.
- [25] Ferrier, G., A. Hladio, D. Thomson, G. Bridges, M. Hedayatipoor, S. Olson, M. Freeman, Microfluidic electromanipulation with capacitive detection for the mechanical analysis of cells. *Biomicrofluidics* 2(4): 044102, 2008.
- [26] Murali, S., A.V. Jagtiani, X. Xia, J. Carletta, J. Zhe, A microfluidic Coulter counting device for metal wear detection in lubrication oil. *Review of Scientific Instruments* 80(1): 016105, 2009.
- [27] Nikolic-Jaric, M., S. Romanuik, G. Ferrier, G. Bridges, M. Butler, K. Sunley, D. Thomson, M. Freeman, Microwave frequency sensor for detection of biological cells in microfluidic channels. *Biomicrofluidics* 3(3): 034103, 2009.
- [28] Wood, D., S.-H. Oh, S.-H. Lee, H. Soh, A. Cleland, High-bandwidth radio frequency Coulter counter. *Applied Physics Letters* 87(18): 184106, 2005.
- [29] Bohunicky, B., S.A. Mousa, Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. *Nanotechnology, science and applications* 4: 1-10, 2011.
- [30] Turner, A.P., Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews* 42(8): 3184-3196, 2013.
- [31] Wang, J., Electrochemical glucose biosensors. *Chemical reviews* 108(2): 814-825, 2008.

- [32] Zhao, W., M.M. Ali, S.D. Aguirre, M.A. Brook, Y. Li, Paper-based bioassays using gold nanoparticle colorimetric probes. *Analytical chemistry* 80(22): 8431-8437, 2008.
- [33] Laczka, O., E. Baldrich, F.X. Muñoz, F.J. del Campo, Detection of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* using interdigitated microelectrode capacitive immunosensors: the importance of transducer geometry. *Analytical chemistry* 80(19): 7239-7247, 2008.
- [34] Maalouf, R., C. Fournier-Wirth, J. Coste, H. Chebib, Y. Saïkali, O. Vittori, A. Errachid, J.-P. Cloarec, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, Label-free detection of bacteria by electrochemical impedance spectroscopy: comparison to surface plasmon resonance. *Analytical chemistry* 79(13): 4879-4886, 2007.
- [35] Radke, S.M., E.C. Alocilja, A high density microelectrode array biosensor for detection of *E. coli* O157: H7. *Biosensors and Bioelectronics* 20(8): 1662-1667, 2005.
- [36] Seven, B., M. Bourourou, K. Elouarzaki, J.F. Constant, C. Gondran, M. Holzinger, S. Cosnier, S. Timur, Impedimetric biosensor for cancer cell detection. *Electrochemistry Communications* 37: 36-39, 2013.
- [37] Zheng, Y., J. Nguyen, Y. Wei, Y. Sun, Recent advances in microfluidic techniques for single-cell biophysical characterization. *Lab on a Chip* 13(13): 2464-2483, 2013.
- [38] Petersen, K.E., Silicon as a mechanical material. *Proceedings of the IEEE* 70(5): 420-457, 1982.
- [39] Manz, A., Y. Miyahara, J. Miura, Y. Watanabe, H. Miyagi, K. Sato, Design of an open-tubular column liquid chromatograph using silicon chip technology. *Sensors and actuators B: Chemical* 1(1): 249-255, 1990.
- [40] Reston, R.R., E.S. Kolesar Jr, Silicon-micromachined gas chromatography system used to separate and detect ammonia and nitrogen dioxide. I. Design,

fabrication, and integration of the gas chromatography system. *Microelectromechanical Systems, Journal of* 3(4): 134-146, 1994.

- [41] Manz, A., D.J. Harrison, E.M. Verpoorte, J.C. Fetting, A. Paulus, H. Lüdi, H.M. Widmer, Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems: capillary electrophoresis on a chip. *Journal of Chromatography A* 593(1): 253-258, 1992.
- [42] Mathies, R.A., X.C. Huang, Capillary array electrophoresis: an approach to high-speed, high-throughput DNA sequencing. *Nature* 359(6391): 167-169, 1992.
- [43] Harrison, D.J., K. Fluri, K. Seiler, Z. Fan, C.S. Effenhauser, A. Manz, Micromachining a miniaturized capillary electrophoresis-based chemical analysis system on a chip. *Science-New York Then Washington-* 261: 895-895, 1993.
- [44] Woolley, A.T., R.A. Mathies, Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(24): 11348-11352, 1994.
- [45] Kim, J.A., J.Y. Lee, S. Seong, S.H. Cha, S.H. Lee, J.J. Kim, T.H. Park, Fabrication and characterization of a PDMS–glass hybrid continuous-flow PCR chip. *Biochemical Engineering Journal* 29(1): 91-97, 2006.
- [46] Park, T., S. Lee, G.H. Seong, J. Choo, E.K. Lee, Y.S. Kim, W.H. Ji, S.Y. Hwang, D.-G. Gweon, S. Lee, Highly sensitive signal detection of duplex dye-labelled DNA oligonucleotides in a PDMS microfluidic chip: confocal surface-enhanced Raman spectroscopic study. *Lab on a Chip* 5(4): 437-442, 2005.
- [47] Ohno, K.i., K. Tachikawa, A. Manz, Microfluidics: applications for analytical purposes in chemistry and biochemistry. *Electrophoresis* 29(22): 4443-4453, 2008.
- [48] Yin, H., D. Marshall, Microfluidics for single cell analysis. *Current opinion in biotechnology* 23(1): 110-119, 2012.

- [49] Zeng, J., Modeling and simulation of electrified droplets and its application to computer-aided design of digital microfluidics. *Computer-Aided Design of Integrated Circuits and Systems, IEEE Transactions on* 25(2): 224-233, 2006.
- [50] Guo, M.T., A. Rotem, J.A. Heyman, D.A. Weitz, Droplet microfluidics for high-throughput biological assays. *Lab on a Chip* 12(12): 2146-2155, 2012.
- [51] Glawdel, T., C. Elbuken, C. Ren, Passive droplet trafficking at microfluidic junctions under geometric and flow asymmetries. *Lab on a Chip* 11(22): 3774-3784, 2011.
- [52] Glawdel, T., C. Elbuken, C.L. Ren, Droplet formation in microfluidic T-junction generators operating in the transitional regime. I. Experimental observations. *Physical Review E* 85(1): 016322, 2012.
- [53] Chakraborty, S., *Microfluidics and microfabrication*. Springer: 2010.
- [54] Kirby, B.J., *Micro-and nanoscale fluid mechanics: transport in microfluidic devices*. Cambridge University Press: 2010.
- [55] Tabeling, P., *Introduction to microfluidics*. Oxford: Oxford University Press, 2005.
- [56] Sims, C.E., N.L. Allbritton, Analysis of single mammalian cells on-chip. *Lab on a Chip* 7(4): 423-440, 2007.
- [57] Svahn, H.A., A.v.d. Berg, Single cells or large populations? *Lab on a Chip* 7(5): 544-546, 2007.
- [58] Beebe, D.J., G.A. Mensing, G.M. Walker, Physics and applications of microfluidics in biology. *Annual review of biomedical engineering* 4(1): 261-286, 2002.
- [59] Squires, T.M., S.R. Quake, Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Reviews of modern physics* 77(3): 977, 2005.

- [60] Stone, H.A., A.D. Stroock, A. Ajdari, Engineering flows in small devices: microfluidics toward a lab-on-a-chip. *Annu. Rev. Fluid Mech.* 36: 381-411, 2004.
- [61] Thorsen, T., S.J. Maerkl, S.R. Quake, Microfluidic large-scale integration. *Science* 298(5593): 580-584, 2002.
- [62] Whitesides, G., A. Stroock, Flexible methods for microfluidics. *Phys Today* 54(6): 42-48, 2001.
- [63] Whitesides, G.M., The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442: 368-373, 2006.
- [64] Morgan, H., N.G. Green, AC electrokinetic: colloids and nanoparticles: 2003.
- [65] Pethig, R., Dielectric properties of biological materials: biophysical and medical applications. *Electrical Insulation, IEEE Transactions on* (5): 453-474, 1984.
- [66] Pohl, H.A., Dielectrophoresis: the behavior of neutral matter in nonuniform electric fields. Cambridge university press Cambridge: 1978.
- [67] Sun, T., H. Morgan, N.G. Green, Analytical solutions of ac electrokinetics in interdigitated electrode arrays: Electric field, dielectrophoretic and traveling-wave dielectrophoretic forces. *Physical Review E* 76(4): 046610, 2007.
- [68] Voldman, J., Electrical forces for microscale cell manipulation. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8: 425-454, 2006.
- [69] Huang, Y., X.-B. Wang, J. Tame, R. Pethig, Electrokinetic behaviour of colloidal particles in travelling electric fields: studies using yeast cells. *Journal of Physics D: Applied Physics* 26(9): 1528, 1993.
- [70] Morgan, H., N.G. Green, M. Hughes, W. Monaghan, T. Tan, Large-area travelling-wave dielectrophoresis particle separator. *Journal of micromechanics and Microengineering* 7(2): 65, 1997.

- [71] Arnold, W., U. Zimmermann, Electro-rotation: development of a technique for dielectric measurements on individual cells and particles. *Journal of Electrostatics* 21(2): 151-191, 1988.
- [72] Jones, T.B., *Electromechanics of particles*. Cambridge University Press: 2005.
- [73] Fricke, H., A mathematical treatment of the electrical conductivity of colloids and cell suspensions. *The Journal of general physiology* 6(4): 375-384, 1924.
- [74] Fricke, H., A mathematical treatment of the electric conductivity and capacity of disperse systems I. The electric conductivity of a suspension of homogeneous spheroids. *Physical Review* 24(5): 575, 1924.
- [75] Fricke, H., A mathematical treatment of the electric conductivity and capacity of disperse systems II. The capacity of a suspension of conducting spheroids surrounded by a non-conducting membrane for a current of low frequency. *Physical Review* 26(5): 678, 1925.
- [76] Cole, K.S., Electric phase angle of cell membranes. *The Journal of general physiology* 15(6): 641-649, 1932.
- [77] Schwan, H.P., Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Advances in biological and medical physics* 5: 147-209, 1956.
- [78] Hoffman, R., T. Johnson, W. Britt, Flow cytometric electronic direct current volume and radiofrequency impedance measurements of single cells and particles. *Cytometry* 1(6): 377-384, 1981.
- [79] Saleh, O., L. Sohn, Quantitative sensing of nanoscale colloids using a microchip Coulter counter. *Review of Scientific Instruments* 72(12): 4449-4451, 2001.
- [80] Shinwari, M.W., D. Zhitomirsky, I.A. Deen, P. Selvaganapathy, M.J. Deen, D. Landheer, Microfabricated reference electrodes and their biosensing applications. *Sensors* 10(3): 1679-1715, 2010.

- [81] Zhou, J., K. Ren, Y. Zheng, J. Su, Y. Zhao, D. Ryan, H. Wu, Fabrication of a microfluidic Ag/AgCl reference electrode and its application for portable and disposable electrochemical microchips. *Electrophoresis* 31(18): 3083-3089, 2010.
- [82] Zheng, S., M. Liu, Y.-C. Tai, Micro coulter counters with platinum black electroplated electrodes for human blood cell sensing. *Biomedical Microdevices* 10(2): 221-231, 2008.
- [83] Chun, H., T.D. Chung, H.C. Kim, Cytometry and velocimetry on a microfluidic chip using polyelectrolytic salt bridges. *Analytical chemistry* 77(8): 2490-2495, 2005.
- [84] Kim, K.B., H. Chun, H.C. Kim, T.D. Chung, Red blood cell quantification microfluidic chip using polyelectrolytic gel electrodes. *Electrophoresis* 30(9): 1464-1469, 2009.
- [85] Choi, H., K.B. Kim, C.S. Jeon, I. Hwang, S. Lee, H.K. Kim, H.C. Kim, T.D. Chung, A label-free DC impedance-based microcytometer for circulating rare cancer cell counting. *Lab on a Chip* 13(5): 970-977, 2013.
- [86] DeBlois, R., C. Bean, Counting and sizing of submicron particles by the resistive pulse technique. *Review of Scientific Instruments* 41(7): 909-916, 1970.
- [87] Benazzi, G., D. Holmes, T. Sun, M. Mowlem, H. Morgan, Discrimination and analysis of phytoplankton using a microfluidic cytometer. *Iet Nanobiotechnology* 1(6): 94-101, 2007.
- [88] Cheung, K., S. Gawad, P. Renaud, Impedance spectroscopy flow cytometry: On-chip label-free cell differentiation. *Cytometry Part A* 65(2): 124-132, 2005.
- [89] Cheung, K.C., M. Di Berardino, G. Schade-Kampmann, M. Hebeisen, A. Pierzchalski, J. Bocsi, A. Mittag, A. Tárnok, Microfluidic impedance-based flow cytometry. *Cytometry Part A* 77(7): 648-666, 2010.

- [90] Holmes, D., D. Pettigrew, C.H. Reccius, J.D. Gwyer, C. van Berkel, J. Holloway, D.E. Davies, H. Morgan, Leukocyte analysis and differentiation using high speed microfluidic single cell impedance cytometry. *Lab on a Chip* 9(20): 2881-2889, 2009.
- [91] Fuller, C.K., J. Hamilton, H. Ackler, P. Krulevitch, B. Boser, A. Eldredge, F. Becker, J. Yang, P. Gascoyne, Microfabricated multi-frequency particle impedance characterization system. In: *Proceedings of the μ TAS symposium*, May 2000, Enschede-Netherlands: 265-268, 2000.
- [92] Sohn, L., O. Saleh, G. Facer, A. Beavis, R. Allan, D. Notterman, Capacitance cytometry: Measuring biological cells one by one. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(20): 10687-10690, 2000.
- [93] Iliescu, C., D.P. Poenar, M. Carp, F.C. Loe, A microfluidic device for impedance spectroscopy analysis of biological samples. *Sensors and Actuators B: Chemical* 123(1): 168-176, 2007.
- [94] Küttel, C., E. Nascimento, N. Demierre, T. Silva, T. Braschler, P. Renaud, A.G. Oliva, Label-free detection of *Babesia bovis* infected red blood cells using impedance spectroscopy on a microfabricated flow cytometer. *Acta tropica* 102(1): 63-68, 2007.
- [95] Morgan, H., D. Holmes, N.G. Green, High speed simultaneous single particle impedance and fluorescence analysis on a chip. *Current Applied Physics* 6(3): 367-370, 2006.
- [96] Demierre, N., T. Braschler, P. Linderholm, U. Seger, H. Van Lintel, P. Renaud, Characterization and optimization of liquid electrodes for lateral dielectrophoresis. *Lab on a Chip* 7(3): 355-365, 2007.
- [97] Gawad, S., K. Cheung, U. Seger, A. Bertsch, P. Renaud, Dielectric spectroscopy in a micromachined flow cytometer: theoretical and practical considerations. *Lab on a Chip* 4(3): 241-251, 2004.

- [98] Linderholm, P., P. Renaud, Comment on “AC frequency characteristics of coplanar impedance sensors as design parameters” by Jongin Hong, Dae Sung Yoon, Sung Kwan Kim, Tae Song Kim, Sanghyo Kim, Eugene Y. Pak and Kwangsoo No, *Lab Chip*, 2005, 5, 270. *Lab on a Chip* 5(12): 1416-1417, 2005.
- [99] Linderholm, P., U. Seger, P. Renaud, Analytical expression for electric field between two facing strip electrodes in microchannel. *Electronics Letters* 42(3): 2, 2006.
- [100] Sun, T., N.G. Green, S. Gawad, H. Morgan, Analytical electric field and sensitivity analysis for two microfluidic impedance cytometer designs. *Iet Nanobiotechnology* 1(5): 69-79, 2007.
- [101] Schade-Kampmann, G., A. Huwiler, M. Hebeisen, T. Hessler, M. Di Berardino, On-chip non-invasive and label-free cell discrimination by impedance spectroscopy. *Cell proliferation* 41(5): 830-840, 2008.
- [102] Rodriguez-Trujillo, R., O. Castillo-Fernandez, M. Garrido, M. Arundell, A. Valencia, G. Gomila, High-speed particle detection in a micro-Coulter counter with two-dimensional adjustable aperture. *Biosensors and Bioelectronics* 24(2): 290-296, 2008.
- [103] Rodriguez-Trujillo, R., C. Mills, J. Samitier, G. Gomila, Low cost micro-Coulter counter with hydrodynamic focusing. *Microfluidics and Nanofluidics* 3(2): 171-176, 2007.
- [104] Watkins, N., B.M. Venkatesan, M. Toner, W. Rodriguez, R. Bashir, A robust electrical microcytometer with 3-dimensional hydrofocusing. *Lab on a Chip* 9(22): 3177-3184, 2009.
- [105] Jang, L.-S., M.-H. Wang, Microfluidic device for cell capture and impedance measurement. *Biomedical microdevices* 9(5): 737-743, 2007.
- [106] Malleo, D., J.T. Nevill, L.P. Lee, H. Morgan, Continuous differential impedance spectroscopy of single cells. *Microfluidics and nanofluidics* 9(2-3): 191-198, 2010.

- [107] Cho, S., H. Thielecke, Micro hole-based cell chip with impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics* 22(8): 1764-1768, 2007.
- [108] Han, K.-H., A. Han, A.B. Frazier, Microsystems for isolation and electrophysiological analysis of breast cancer cells from blood. *Biosensors and bioelectronics* 21(10): 1907-1914, 2006.
- [109] Lan, K.-C., L.-S. Jang, Integration of single-cell trapping and impedance measurement utilizing microwell electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* 26(5): 2025-2031, 2011.
- [110] Di Carlo, D., N. Aghdam, L.P. Lee, Single-cell enzyme concentrations, kinetics, and inhibition analysis using high-density hydrodynamic cell isolation arrays. *Analytical chemistry* 78(14): 4925-4930, 2006.
- [111] Di Carlo, D., L.Y. Wu, L.P. Lee, Dynamic single cell culture array. *Lab on a Chip* 6(11): 1445-1449, 2006.
- [112] Cho, Y., H.S. Kim, A.B. Frazier, Z.G. Chen, D.M. Shin, A. Han, Whole-cell impedance analysis for highly and poorly metastatic cancer cells. *Microelectromechanical Systems, Journal of* 18(4): 808-817, 2009.
- [113] Li, S., L. Lin, A single cell electrophysiological analysis device with embedded electrode. *Sensors and Actuators A: Physical* 134(1): 20-26, 2007.
- [114] Kurz, C.M., H. Büth, A. Sossalla, V. Vermeersch, V. Toncheva, P. Dubruel, E. Schacht, H. Thielecke, Chip-based impedance measurement on single cells for monitoring sub-toxic effects on cell membranes. *Biosensors and Bioelectronics* 26(8): 3405-3412, 2011.
- [115] Mishra, N.N., S. Retterer, T.J. Zieziulewicz, M. Isaacson, D. Szarowski, D.E. Mousseau, D.A. Lawrence, J.N. Turner, On-chip micro-biosensor for the detection of human CD4⁺ cells based on AC impedance and optical analysis. *Biosensors and Bioelectronics* 21(5): 696-704, 2005.
- [116] Cheng, X., Y.-s. Liu, D. Irimia, U. Demirci, L. Yang, L. Zamir, W.R. Rodriguez, M. Toner, R. Bashir, Cell detection and counting through cell lysate

- impedance spectroscopy in microfluidic devices. *Lab on a Chip* 7(6): 746-755, 2007.
- [117] Wang, Y.-N., Y. Kang, D. Xu, C.H. Chon, L. Barnett, S.A. Kalams, D. Li, D. Li, On-chip counting the number and the percentage of CD4⁺ T lymphocytes. *Lab on a Chip* 8(2): 309-315, 2008.
- [118] Pham, V.T., A.T. Chu, T.T. Pham, N.K. Tran, H.D. Pham, T.H. Pham, Silicon nanowires prepared by thermal evaporation and their photoluminescence properties measured at low temperatures. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 2(1): 015016, 2011.
- [119] Karataş, A., Ö. Sonakın, Mikrofabrikasyon Teknolojisi ve İlaç Taşıyıcı Sistemler Üzerinde Uygulamaları. 36(1): 47-74, 2007.
- [120] Xia, Y., G.M. Whitesides, Soft lithography. *Annual review of materials science* 28(1): 153-184, 1998.
- [121] Bilican, I., M.T. Guler, N. Gulener, M. Yuksel, S. Agan, Capacitive solvent sensing with interdigitated microelectrodes. *Microsystem Technologies* 22: 659-668, 2016.
- [122] Peterson, S.L., A. McDonald, P.L. Gourley, D.Y. Sasaki, Poly (dimethylsiloxane) thin films as biocompatible coatings for microfluidic devices: cell culture and flow studies with glial cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 72(1): 10-18, 2005.
- [123] Chen, Q., G. Li, Y. Nie, S. Yao, J. Zhao, Investigation and improvement of reversible microfluidic devices based on glass–PDMS–glass sandwich configuration. *Microfluidics and nanofluidics* 16(1-2): 83-90, 2014.
- [124] Bernabini, C., D. Holmes, H. Morgan, Micro-impedance cytometry for detection and analysis of micron-sized particles and bacteria. *Lab on a Chip* 11(3): 407-412, 2011.
- [125] Sun, T., H. Morgan, Single-cell microfluidic impedance cytometry: a review. *Microfluidics and Nanofluidics* 8(4): 423-443, 2010.

- [126] Aoki, R., M. Yamada, M. Yasuda, M. Seki, In-channel focusing of flowing microparticles utilizing hydrodynamic filtration. *Microfluidics and nanofluidics* 6(4): 571, 2009.
- [127] Choi, E., B. Kim, J. Park, High-throughput microparticle separation using gradient traveling wave dielectrophoresis. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 19(12): 125014, 2009.
- [128] Chung, C.-C., T. Glawdel, C.L. Ren, H.-C. Chang, Combination of ac electroosmosis and dielectrophoresis for particle manipulation on electrically-induced microscale wave structures. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 25(3): 035003, 2015.
- [129] Paiè, P., F. Bragheri, R.M. Vazquez, R. Osellame, Straightforward 3D hydrodynamic focusing in femtosecond laser fabricated microfluidic channels. *Lab on a Chip* 14(11): 1826-1833, 2014.
- [130] Du, E., S. Ha, M. Diez-Silva, M. Dao, S. Suresh, A.P. Chandrakasan, Electric impedance microflow cytometry for characterization of cell disease states. *Lab on a chip* 13(19): 3903-3909, 2013.
- [131] van Berkel, C., J.D. Gwyer, S. Deane, N. Green, J. Holloway, V. Hollis, H. Morgan, Integrated systems for rapid point of care (PoC) blood cell analysis. *Lab on a Chip* 11(7): 1249-1255, 2011.
- [132] Anderson, J.R., D.T. Chiu, H. Wu, O. Schueller, G.M. Whitesides, Fabrication of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). *Electrophoresis* 21(1): 27-40, 2000.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : İsmail BİLİCAN

Doğum Tarihi : 04.07.1988

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu :

Lisans : Kocaeli Üniversitesi (2006-2010)

Yüksek Lisans: Kırıkkale Üniversitesi (2010-2012)

Çalıştığı Kurum ve Yıllar:

Aksaray Üniversitesi 2013- ...

Yayınları (SCI) :

Isiksacan Z., M.T. Guler, B. Aydogdu, **I. Bilican** and C. Elbuken, Rapid fabrication of microfluidic PDMS devices from reusable PDMS molds using laser ablation. Journal of Micromechanics and Microengineering 26(3): 035008 2016

Bilican I., M.T. Guler, N. Gulener, M. Yuksel and S. Agan, Capacitive solvent sensing with interdigitated microelectrodes. Microsystem Technologies, 22(3): 659-668 2015

Guler M.T., **I. Bilican**, S. Agan and C. Elbuken, A simple approach for the fabrication of 3D microelectrodes for impedimetric sensing. Journal of Micromechanics and Microengineering, 25(9): 95019 2015

Yasar S., S. Kahraman, S. Cetinkaya and **I. Bilican**, Improved characteristics for chemically grown Cu₂SnS₃ promising solar absorbers through the use of TritonX-100® surfactant. Journal of Alloys and Compounds, 618, 217-221 2015

Kahraman S., S. Yasar, S. Cetinkaya and **I. Bilican**, Polyethylene glycol-assisted growth of Cu₂SnS₃ promising absorbers for thin film solar cell applications. Philosophical Magazine, 94(27): 3149-3161 2014

Yayınları (Diğer) :

Yasar S., **I. Bilican**, M. Oduncuoglu, S. Agan and I. Uluer, Optical Properties of In_xGa_{1-x}NyAs_{1-y}/GaAs Heterostructure Quantum Well Lasers for 1.3 µm Laser Emission with Different In/N Concentrations. International Journal of Scientific and Technological Research, 1(1): 167-175 2015.

Yasar S., **I. Bilican**, M. Oduncuoglu, S. Agan and I. Uluer, The Theoretical Investigation of InGaAs/GaAs Quantum Well Lasers Systems. International Journal of Scientific and Technological Research, 1(1): 197-201 2015.

Araştırma Alanları : Mikroakışkanlar, Biyosensörler, Mikro Fabrikasyon